

Exploration des états internes de la larve de poisson-zèbre grâce à la température

Guillaume Le Goc

▶ **To cite this version:**

Guillaume Le Goc. Exploration des états internes de la larve de poisson-zèbre grâce à la température. Zoologie des invertébrés. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS174 . tel-03404623v2

HAL Id: tel-03404623
https://hal.science/tel-03404623v2

Submitted on 15 Dec 2021

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.

SORBONNE UNIVERSITÉ

LABORATOIRE Jean Perrin

THÈSE DE DOCTORAT

de Sorbonne Université

Spécialité : Physique

École doctorale n°564: Physique en Île-de-France

réalisée

au Laboratoire Jean Perrin

sous la direction de Georges DEBRÉGEAS et Raphaël CANDELIER

présentée par

Guillaume LE GOC

Sujet de la thèse :

Exploration des états internes de la larve de poisson-zèbre grâce à la température

soutenue le 1 octobre 2021

devant le jury composé de :

M.	Neri Peter,	Rapporteur
M.	Sumbre Germán,	Rapporteur
M^me^	Yamamoto Kei,	Examinatrice
M.	Clément Éric,	Examinateur
M.	Candelier Raphaël,	Co-directeur de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Abstract

Animals have to continuously adapt to their environment. Spontaneous behavior is thus modulated by sensory cues extracted from its environment, but shows an intrinsic variability, both between individuals and within individuals. The regulation of the internal state that defines the observed behavior at each moment, and how it is modulated by environmental conditions, remains elusive. In this thesis, we use zebrafish larva, a vertebrate amenable to whole-brain imaging, to probe these internal dynamics. Temperature allows the modulation of individual internal dynamics and serves as a lever for the study of variability in this animal.

A behavioral study allowed us to establish how the paramaters that control fish navigation were dependent on both absolute temperature and its temporal variation, allowing the animal to confine itself to a temperature range of 22–28°C. We also mapped whole-brain neural response to brief thermal stimuli. These demonstrate that regions involved in processing hot and cold signals are distinct and both widely distributed throughout the brain.

In a second part, we focused on exploratory behavior and its variability for larvae swimming in water at different temperatures without thermal gradient. We showed that the swimming dynamics is constrained within a fixed space defined by the statistical structure of the different kinematic parameters, a space probed by the animal over several tens of minutes. We then focused on a neural circuit controlling the orientation of the swim (right vs left), whose activity shows a persistence property over long times. We showed that behavioral and neural orientational persistence times evolve consistently with bath temperature. These neural recording data were used to train a network model (Ising model) able to reproduce the observed neural dynamics.

In conclusion, this work has provided a quantitative description of the spontaneous exploratory dynamics of larval zebrafish, its stochastic and variable character, and the influence of temperature on this behavior. Functional imaging, coupled with neural circuit modeling, has allowed us to shed light on some of the neural mechanisms behind these oberservations.

Keywords : Zebrafish · variability · navigation · locomotion · behavior · calcium imaging · temperature

Résumé

Les animaux doivent constamment s'adapter à leur environnement pour survivre. Le comportement spontané de l'animal est donc modulé par les informations sensorielles qu'il extrait de son environnement, mais présente une variabilité intrinsèque, à la fois entre individus et au sein d'un même individu. La régulation de l'état interne qui définit à chaque instant le comportement observé, et comment celui-ci peut être modulé par les conditions environnementales, reste mal comprise. Dans le cadre de cette thèse, nous utilisons la larve de poisson-zèbre, un vertébré permettant l'enregistrement de l'ensemble du cerveau, pour sonder cette dynamique interne. La température permet la modulation des dynamiques internes individuelles et sert de levier pour l'étude de la variabilité chez cet animal.

Une étude comportementale nous a permis d'établir comment les paramètres qui contrôlent la navigation du poisson dépendaient à la fois de la température absolue et de sa variation temporelle, permettant à l'animal de se confiner dans une plage de température de 22–28°C. Nous avons par ailleurs établi les cartes de réponses neuronales à l'échelle du cerveau entier à de brefs stimuli thermiques. Elles démontrent que les régions impliquées dans le traitement des signaux chauds et froids sont distinctes et toutes deux largement distribuées dans l'ensemble du cerveau.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés au comportement exploratoire et à sa variabilité pour des larves nageant dans de l'eau à différentes températures en l'absence de gradient thermique. Nous avons montré que la dynamique de nage est contrainte à un espace fixe défini par la structure statistique des différents paramètres cinématiques, espace sondé par l'animal sur des temps caractéristiques de plusieurs dizaines de minutes. Nous nous sommes ensuite focalisés sur un circuit neuronal qui contrôle l'orientation de la nage (droite vs gauche), dont l'activité présente une propriété de persistance sur des temps longs. Nous avons montré que les temps de persistance orientationnelle comportementaux et neuronaux évoluent de manière cohérente avec la température du bain. Ces données d'enregistrement neuronaux ont servi à entraîner un modèle sur réseau (modèle d'Ising) capable de reproduire la dynamique neuronale observée.

En conclusion, ce travail a permis de fournir une description quantitative de la dynamique exploratoire spontanée de la larve de poisson zèbre, son caractère stochastique et variable, et l'influence de la température sur ce comportement. L'imagerie fonctionnelle, couplée à la modélisation des circuits neuronaux, nous a permis d'éclairer certains des mécanismes neuronaux à l'origine de ces observations.

Mots-clés : Poisson-zèbre · variabilité · navigation · locomotion · comportement · imagerie calcique · température

Remerciements

Dans le désordre.

Merci à G.D. et R.C. Merci à S.K., G.M., J.L. et T.P. Merci à N.B.C., H.M., H.T., B.G., N.E., A.S., T.P. et D.L. Merci à R.M., S.C. et S.W.

Merci à S.C., A.N., M.D.K., T.v.d.P. et A.H. Merci à M.P. et A.Z. Merci à D.C., V.B. et G.M.D. Merci à M.D. et J.R., A.B. et S.T.

Merci également à M., P., Y.L.G. et M.T. ; à S., A., et P. L.C. ; A.J., M. et G.

Évidemment merci à G.R., L.C., S.C. et L.P. ; à M.A.B. et à J.L. ; à A.S. et A.B., à C.P.B., T.L., L.L. et M.P. Merci aussi à V. et à L.V.

Ces travaux n'auraient peut-être pas vu le jour sans vous, et ça aurait de toute façon été *infiniment* moins bien. Amour et amitiés à vous toutes et tous.

Table des matières

I Introduction **1**

I.1 Parcourir le monde . . . 1

I.2 Mesure de l'activité neuronale . . . 2

I.3 Le poisson-zèbre comme modèle en neurosciences . . . 6

I.3.1 État de l'art . . . 6

I.3.2 Locomotion de la larve de poisson-zèbre . . . 9

I.4 La température comme modalité sensorielle . . . 11

I.4.1 Perception de la température . . . 11

I.4.2 Intégration de la température chez la larve de poisson-zèbre . . . 12

II Gradient et stimulation thermiques **19**

II.1 Comportement dans un gradient . . . 19

II.1.1 Dispositif expérimental . . . 19

a) Bassin et éclairage . . . 19

b) Contrôle de la température . . . 21

c) Protocole expérimental . . . 23

II.1.2 Méthodes d'analyse . . . 24

a) *Tracking* . . . 24

b) Détection des mouvements et paramètres cinématiques . . . 27

II.1.3 Résultats . . . 28

a) Température préférée . . . 28

b) Intégration du gradient . . . 30

II.1.4 Discussion . . . 39

II.2 Réponse neuronale à des jets d'eau . . . 41

II.2.1 Dispositif expérimental . . . 41

a) Microscope à feuille de lumière . . . 41

b) Module de stimulation thermique . . . 46

II.2.2 Méthodes d'analyse . . . 49

a) Pré-traitement des données 50
b) Extraction des signaux 50
c) Alignement du cerveau sur un atlas morphologique 54
d) Conditionnement et export 54
II.2.3 Résultats préliminaires : cartes de réponse 55
II.3 Conclusions 65

III Activité spontanée **69**
III.1 Variabilité et modulation thermique des statistiques locomotrices 69
III.1.1 Résumé 70
III.1.2 Article 73
III.1.3 Discussion 91
III.2 Activité neuronale spontanée : le cas de l'ARTR 92
III.2.1 L'ARTR, un circuit contrôlant la direction de la nage 92
III.2.2 Procédure expérimentale d'enregistrement de l'ARTR 95
III.2.3 L'activité de l'ARTR est modulée par la température 97
III.2.4 Un modèle d'Ising capture la dynamique de l'ARTR 101
III.2.5 Discussion 108

IV Conclusion **111**
IV.1 Résumé 111
IV.2 Perspectives 112

A Modélisation de l'activité spontanée du cerveau entier **115**

Bibliographie **121**

Chapitre I

Introduction

I.1 Parcourir le monde

Pour survivre, vivre et se développer, les organismes vivants doivent en permanence s'adapter aux contraintes de leur environnement, une entité évoluant sur toutes les échelles spatio-temporelles possibles. L'ensemble des biocénoses (êtres vivants, leurs organisations et interactions) s'adapte donc continuellement à ces changements. La caractérisation de ces modifications fait appel à une multitude de disciplines, allant de l'épigénétique aux sciences climatiques. Un moyen d'adaptation, situé à une échelle intermédiaire, est la faculté qu'ont certains organismes de se déplacer : la locomotion. Au delà du mouvement, qu'on observe dans le règne végétal, la locomotion permet aux organismes motiles de bouger l'ensemble de leurs corps à une nouvelle position, leur permettant de se nourrir, de se reproduire et d'interagir avec d'autres communautés, intra ou inter-espèces. Les informations extérieures sont ainsi couplées à la dynamique propre de chaque individu et traitées pour que ce dernier accomplisse les tâches nécessaires à sa survie et/ou à sa prospérité. Prendre en compte les éléments extérieurs pour explorer son environnement implique toute une chaîne de processus, de la captation de l'information à la génération d'un mouvement. Chez certains organismes, cette chaîne peut être assez directe. La bactérie *E. coli* est par exemple capable de remonter un gradient chimique d'acides aminés [1], ces derniers provoquant une stabilisation des flagelles (qui permettent la locomotion chez les bactéries) grâce à une cascade de réactions chimiques, réprimant ainsi les changements de direction lorsque la bactérie se déplace vers la source chimique. Dans ce cas, la captation de l'information et son traitement sont quasi-confondus. Au contraire, certains organismes sont dotés de cellules nerveuses capables de transformer les informations sensorielles extérieures en signaux électriques, tandis que d'autres cellules nerveuses sont chargées de moduler l'activité des muscles pour se mouvoir en fonction des signaux reçus

depuis les autres cellules. L'ensemble de ces cellules, les neurones, forment le système nerveux.

Schématiquement, cet ensemble peut être considéré comme une "boîte" avec des entrées (sensorielles) et des sorties (motrices). Les entrées, qui peuvent correspondre à des modalités sensorielles multiples, doivent être traitées pour générer des sorties appropriées. Ces sorties sont ensuite retraitées par le système sous forme de copie d'efférence formant une boucle sensorimotrice, permettant à l'individu d'ajuster continuellement son comportement en fonction de ce qu'il est en train de faire. Comprendre ce qu'il se passe dans cette boîte est l'enjeu d'une partie des neurosciences, en sachant que si l'on coupe une partie des entrées, il subsiste des sorties. En effet, en l'absence de stimulation sensorielle, l'organisme doit toujours assurer ses fonctions métaboliques (respiration, battements de cœur(s), digestion...) et explorer son environnement à la recherche de ces stimulations, ce qui constitue l'activité spontanée, auto-induite par l'organisme.

Enfin, il faut garder à l'esprit que chaque boîte est unique et dépendante du temps. Au sein d'une même espèce, d'une même communauté, chaque individu a ainsi sa dynamique propre, différente de ses congénères. Pour un organisme donné, cette dynamique dépend également du moment que l'on considère : l'état de la boîte change selon le stade de développement, le moment de la journée, et peut même changer sur des heures ou des minutes. Le premier type de variabilité, inter-individuelle, permet à une population de s'adapter rapidement à un brusque changement dans les conditions environnementales et assurer la survie de la communauté [2]. Le deuxième type, la variabilité intra-individuelle, permet à l'animal de changer de régime au cours du temps [3], par exemple alterner entre exploration (chercher une proie) et exploitation (la chasser) ou encore alterner entre activité et repos. Cela définit l'état interne de l'animal, qui détermine la façon dont sont traitées les informations sensorielles extérieures, qui à leur tour module cet état [3]. L'étude du comportement d'un animal permet de caractériser partiellement l'évolution temporelle de cet état interne et, sous stimulation, inférer les stratégies retenues pour se diriger dans l'environnement, tandis que les progrès techniques réalisés depuis près d'un siècle permettent aujourd'hui de sonder cette boîte, le cerveau, pour essayer d'expliquer comment les algorithmes de navigation y sont implémentés et comment sont régulés les états internes.

I.2 Mesure de l'activité neuronale

Un système nerveux, dont le cerveau occupe souvent une place centrale, consiste en un amas de cellules appelées neurones, interconnectées entre elles, formant plusieurs réseaux complexes. Un neurone est donc l'unité de base du système nerveux permettant aux

êtres vivants qui en sont dotés de coordonner l'ensemble de leur corps en fonction des informations reçues de l'extérieur. Ce sont des cellules excitables : en ouvrant ou fermant leurs canaux ioniques, elles peuvent envoyer des signaux électriques au reste du réseau grâce à une dépolarisation de leur membrane : on parle de potentiels d'action (*spikes*).

Les premières mesures de l'activité neuronale consistaient à mesurer cette différence de potentiel à l'aide d'électrodes directement placées au niveau du neurone à étudier [4]. Cette méthode permet de mesurer la véritable activité du neurone : il s'agit de la technique ayant la meilleure résolution temporelle, les potentiels d'action durant un temps de l'ordre de quelques millisecondes. En revanche, cela est invasif pour le sujet et l'expérimentateur est limité dans le nombre de neurones enregistrés simultanément. L'électroencéphalographie permet de partiellement pallier à ce problème : des capteurs sont placés en surface (non invasif) et détectent des signaux électriques du cerveau [5]. La résolution temporelle est ainsi conservée et le champ d'observation étendu à l'ensemble du cerveau, mais le signal mesuré est la résultante d'un grand nombre de neurones : la résolution spatiale est très faible. L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) permet également d'estimer indirectement l'activité du cerveau entier, en mesurant les variations de la concentration en oxygène du sang causées par l'activité cérébrale. Une fois encore, cela ne permet que d'enregistrer l'activité de grandes régions du cerveau (la résolution spatiale est de plusieurs millimètres, un neurone ayant une taille de l'ordre du micromètre), avec une faible résolution en temps (de l'ordre de la seconde) [6].

Ces dernières années ont vu se développer une nouvelle technologie permettant l'utilisation de techniques optiques pour la détection de l'activité neuronale. Elle repose sur l'entrée systématique et massive d'ions calcium Ca^{2+} dans la cellule lors d'un potentiel d'action. La mesure de la concentration en ions calcium dans la cellule sert alors de levier pour la mesure de l'activité des neurones. Il existe des molécules dont la fluorescence augmente lorsqu'elles se lient à des ions calcium, permettant le suivi de la concentration en calcium par microscopie de fluorescence. À l'origine synthétiques [7], de telles molécules doivent être injectées manuellement dans le milieu à imager. La technologie s'est rapidement orientée vers les rapporteurs calciques génétiquement encodés (GECI). Ces derniers sont en effet beaucoup plus versatiles puisque que leur expression est directement contrôlée par les gènes de l'organisme étudié : on peut décider où le rapporteur calcique sera exprimé en choisissant le promoteur. On est ainsi capable de générer des lignées transgéniques où le rapporteur calcique est exprimé dans presque tous les neurones, ou simplement dans une région donnée, ou encore dans certains types de populations neuronales (excitatrices, inhibitrices...).

Au laboratoire Jean Perrin, nous utilisons le GECI GCaMP6 [8]. Ce GECI est issu de la fusion de la protéine de fluorescence verte (GFP), de calmoduline (CaM) et d'un

	τ_{rise} (ms)	τ_{decay} (ms)
GCaMP6s	56 ± 3	455 ± 40
GCaMP6f	26 ± 2	140 ± 20

TABLE I.1 – Constantes de temps du rapporteur calcique génétiquement encodé GCaMP6 d'après [10].

peptide (M13). En l'absence de calcium, le rendement quantique de la GFP est faible : il y a peu de fluorescence. Lorsque la calmoduline s'associe au calcium, un changement de conformation a lieu et le rendement quantique de la GFP augmente drastiquement : elle devient excitable optiquement à 480nm (bleu) et fluoresce dans le vert, à 510nm. Lorsque le neurone est au repos, il existe une concentration non nulle de calcium au sein de la cellule et les molécules GCaMP ont une faible fluorescence, cette dernière est alors au niveau qui définit la ligne de base. Lorsque le neurone se dépolarise et émet un potentiel d'action, il y a un influx d'ions calcium, qui se lient aux molécules GCaMP. La fluorescence augmente alors d'un certain pourcentage par rapport à la ligne de base, puis les ions et les rapporteurs se dissocient en un temps déterminé par sa constante de dissociation et qui définit la résolution temporelle de la méthode. La protéine GCaMP6 est suffisamment sensible pour induire une augmentation significative de la fluorescence associée à un seul potentiel d'action [8]. La réponse en fluorescence est décrite ainsi [9] :

$$K(t) \propto \exp\left(-\frac{t}{\tau_{decay}}\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_{rise}}\right)$$

où τ_{rise} est le temps de montée et τ_{decay} le temps de décroissance, avec $\tau_{rise} \ll \tau_{decay}$. $K(t)$ définit ainsi le noyau calcique (*calcium kernel* ou CIRF pour *calcium impulse response function*). La fluorescence enregistrée pour un neurone donné est donc le train de potentiel d'action convolué par le noyau calcique, auquel s'ajoute du bruit.

Plusieurs variétés de GCaMP6 existent : *slow* (GCaMP6s) et *fast* (GCaMP6f), toutes les deux utilisées dans la suite de ce manuscrit. *In vitro*, les constantes de temps mesurées par Dana *et. al.* [10] sont données dans la table I.1. Ces valeurs correspondent aux médianes calculées sur les mesures faites dans une culture cellulaire dissociée. *In vivo*, les constantes de temps observées sont dans les faits un facteur 10 fois plus importantes [11, 12]. La résolution temporelle est donc bien inférieure à celle nécessaire pour identifier un potentiel d'action unique. En effet, il sera difficile de le distinguer d'un train de potentiels d'actions où ces derniers interviennent à une dizaine de millisecondes d'intervalle. La fluorescence résultante présentera alors une seule bouffée.

Ce sacrifice en résolution temporelle n'est néanmoins pas vain : la possibilité d'utiliser des techniques optiques étend le champs des possibilités. Il devient possible d'enregis-

trer de larges populations de neurones avec une résolution micrométrique dans des animaux vivants. Pour imager en volume en microscopie de fluorescence, il faut utiliser des techniques de sectionnement optique. En effet, sans ce dernier, l'ensemble des photons de fluorescence provenant des zones éclairées par le laser d'excitation seront collectés, produisant une image où les signaux provenant des différentes altitudes se superposent. Il existe plusieurs modalités permettant de s'affranchir de ce problème. La microscopie confocale (figure I.1A) résout le problème en plaçant un sténopé dans le plan focal image de l'objectif. Seul les photons issus du plan focal objet passent par le sténopé et ainsi seule cette couche est imagée.
La microscopie 2-photon (figure I.1B) permet d'exciter la GFP avec de l'infrarouge, soit une longueur d'onde deux fois plus grande et une énergie deux fois moindre que le laser bleu utilisé usuellement pour cette protéine. Les fluorophores peuvent absorber quasi-simultanément deux photons infrarouges à la place d'un photon bleu, mais il s'agit d'un événement rare : il faut une forte intensité lumineuse pour générer un signal détectable puisque ce phénomène a une dépendance quadratique avec l'intensité. Le signal détecté chutera à un niveau indétectable en dehors du point focal. Il n'y aura ainsi de la fluorescence que dans ce plan, et on peut également imager en volume. L'utilisation de l'infrarouge permet aussi de limiter la diffusion dans les tissus et l'effet 2-photon limite le photoblanchiement (qui résulte d'une exposition trop fréquente et intense des fluorophores conduisant à leur dénaturation) puisque la fluorescence n'a lieu qu'au point focal. Dans les deux précédentes méthodes, il faut scanner point par point l'échantillon dans les trois dimensions, réduisant ainsi la fréquence d'acquisition du volume entier d'un facteur égal au nombre de points enregistrés. Une troisième méthode, la microscopie par nappe laser, permet de paralléliser l'enregistrement de toute un plan en découplant l'illumination de l'observation, soit en créant une nappe statique avec une lentille cylindrique (figure I.1C), soit en balayant le faisceau laser (figure I.1D). Elle permet également de n'éclairer que les couches enregistrées, diminuant ainsi les risques de photoblanchiement. Cette méthode, utilisée au laboratoire, est détaillée dans la section II.2.1a).

Il a longtemps été admis qu'on pouvait associer à un neurone un rôle bien défini, une hypothèse connue sous le nom de la "théorie du neurone" (*neuron doctrine*) [14]. Identifier la fonction de chaque neurone suffirait alors à apprécier le fonctionnement du cerveau. Il est désormais admis que l'information est portée au niveau du circuit, impliquant des dizaines ou des centaines de neurones [15]. Les neurones sont en effet interconnectés, appartenant à un ou plusieurs réseaux, eux-mêmes connectés les uns aux autres. Un système nerveux comme celui de l'éléphant, composé –entre autres cellules– de plus de 200 milliards de neurones [16] représente donc un réseau à autant de nœuds et deux ordres de grandeurs de plus de connexions et est par conséquent d'une complexité sans pareil.

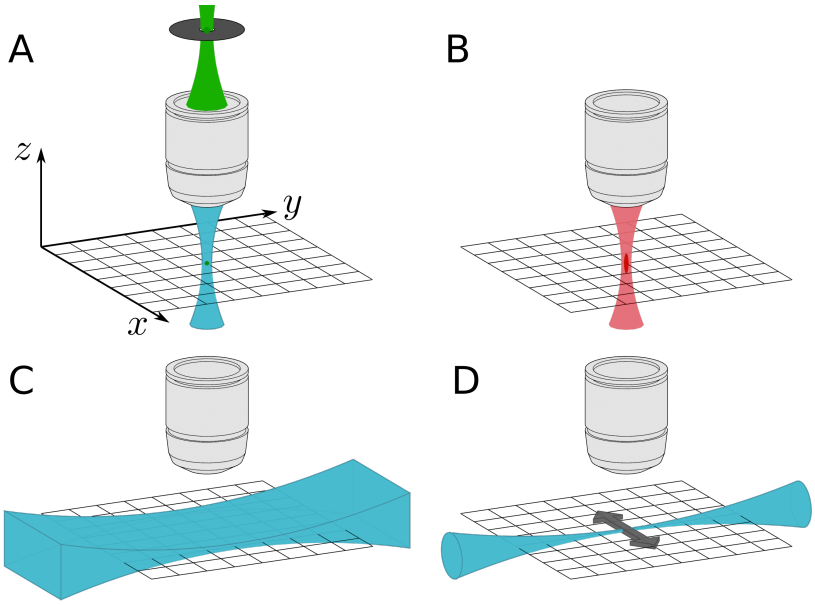


Fig. I.1 *Sectionnement optique pour l'imagerie en volume.* ***A*** *Microscopie confocale. Le sténopé après l'objectif bloque la fluorescence qui n'est pas issue du plan focal de l'objectif.* ***B*** *Microscopie 2-photon. L'effet 2-photon n'a lieu que dans le plan focal de l'objectif.* ***C-D*** *Microscopie à nappe de lumière (SPIM). Découplage de l'illumination et de l'observation. Tout le plan est enregistré en parallèle.* ***C*** *Nappe statique, crée par une lentille cylindrique.* ***D*** *Le laser est balayé. Crédit : Hugo Trentesaux [13]*

Considérer un animal doté d'un cerveau de plusieurs ordres de grandeurs plus modeste comme celui de la souris (environ 70 millions de neurones [17]) représente toujours un défi de taille. Être capable d'enregistrer l'ensemble du système cérébral d'un organisme vivant est donc la première étape dans un vaste et ambitieux projet qui est la compréhension du fonctionnement d'un cerveau. C'est la possibilité qu'offre l'imagerie calcique fonctionnelle utilisée avec un organisme modèle, le poisson-zèbre, décrit dans la section suivante.

I.3 Le poisson-zèbre comme modèle en neurosciences

I.3.1 État de l'art

Le poisson-zèbre, *Danio rerio*, un poisson d'eau douce vivant à l'état sauvage dans les rivières d'Inde et ses pays limitrophes, est décrit pour la première fois par F. Hamilton en 1822 [18]. Robuste, facile à élever et ayant un cycle de reproduction court (maturité à 3 mois [19]), le poisson-zèbre a longtemps été utilisé en aquariophilie avant d'attirer l'intérêt

de la communauté scientifique dans les années 1970, notamment en génétique et biologie du développement. En effet, il s'agit d'un vertébré dont la larve est peu pigmentée ; sa transparence optique partielle permet de suivre le développement des organes internes. Il est également utilisé en pharmacologie pour le criblage (*screening*) de composés chimiques et leur influence sur le développement et le comportement, permettant un haut débit d'expériences. Une portée d'une femelle contient une centaine d'œufs [19], qui, s'ils sont fécondés, éclosent environ 48h plus tard [20]. À 3 jours post-fécondation, la vessie natatoire se gonfle et la larve commence à nager [20].

Son génome a été entièrement séquencé en 2013 [21]. Les travaux dans le domaine de la génétique ont permis la génération de lignées transgéniques, notamment fluorescentes. En tant que vertébré, la structure globale de son système nerveux, comptant une centaine de millier de neurones à 5 jours et un million à l'âge adulte, présente de fortes homologies physiologiques avec les autres animaux de ce sous-embranchement [22] (figure I.3C), ce qui a mené la communauté, qui étudiait principalement le développement neurobiologique, à s'intéresser aussi à son comportement et aux fonctions des circuits neuronaux, à un âge plus tardif (5 jours post-fécondation) [23]. Il est néanmoins bon de rappeler que si on peut dresser des parallèles *hypothétiques* entre fonctions des régions du cerveau de la larve de poisson-zèbre et, au hasard [24], des mammifères comme les primates, on ne pourra jamais revendiquer une dualité entre espèces. En effet, les circuits neuronaux de deux espèces différentes subissent des évolutions différentes et leur fonction peuvent changer dans le temps. Il a par exemple été montré qu'au sein de deux espèces du même ordre, les nudibranches, des neurones homologues impliqués dans un comportement homologue, occupent des places hiérarchiquement différentes dans le circuit conduisant au comportement en question : l'un est dans le circuit générateur (le CPG, *central pattern generator*) tandis que dans l'autre espèce, il est dans le circuit neuromodulateur commandant le CPG [25].

Une mutation, *nacre*, réduit encore plus le nombre de pigment sur la peau du poisson, le rendant pratiquement transparent [26]. L'anatomie basique d'une larve de 5 jours observée à la loupe binoculaire est montrée en figure I.2. Couplée à sa petite taille (quelques millimètres), cela en fait un animal de choix pour l'imagerie optique. L'ingénierie génétique a permis la génération de lignées exprimant des rapporteurs calciques génétiquement encodés, conduisant à l'enregistrement à l'échelle du cerveau entier de l'activité neuronale dans un vertébré vivant et réagissant à des stimulations [27]. Les lignées GCaMP6 utilisées dans le présent manuscrit sont toutes sous le contrôle du promoteur quasi pan-neuronal *elavl3* (HuC), le rapporteur étant exprimé soit dans le noyau (*Tg(elavl3 :H2B-GCaMP6)*) soit dans le cytoplasme (*Tg(elavl3 :GCaMP6)*). Les deux variantes, *slow* [28] et *fast* [29] ont été utilisées. Ces lignées nous ont été fournies par Misha B. Ahrens de Janelia (Ho-

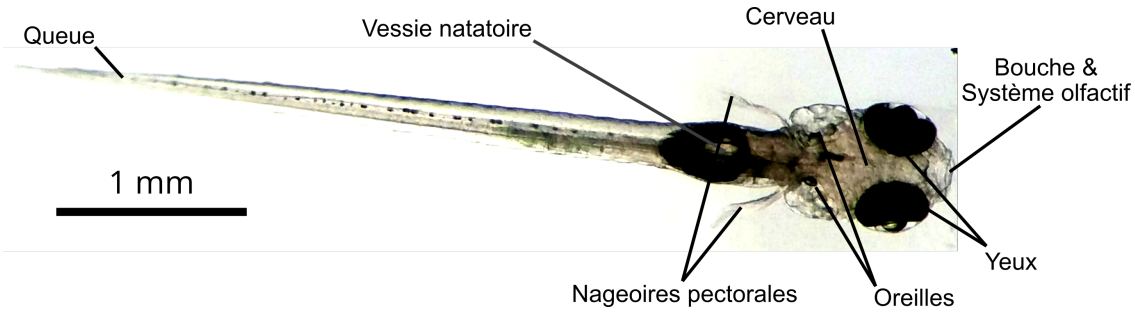


Fig. I.2 *Larve de poisson-zèbre présentant la mutation nacre âgée de 5 jours post-fécondation. Les parties anatomiques basiques et facilement identifiables sont annotées.*

ward Hughes Medical Institute, USA). Un exemple d'image de section de cerveau prise au microscope à nappe de lumière de chaque lignée (cytoplasmique et nucléaire) est montré en figure I.3, ainsi que la structure anatomique du cerveau.

Cet organisme bénéficie également des technologies de manipulations des circuits neuronaux, comme l'optogénétique [31] et l'ablation laser [32]. La première permet d'activer ou d'inhiber un (ou une population de) neurone(s) grâce à la lumière, quand ces neurones expriment des canaux ioniques photoactivables tels que la channelrhodopsine [33, 34]. Un expérimentateur ayant établit un circuit putatif suite à des observations peut alors tester ses hypothèses en activant tel ou tel neurone du circuit. La deuxième, comme son nom l'indique, permet de désactiver de manière permanente un (ou une population de) neurone(s) à l'aide d'un laser puissant. De même, cela permet de tester le rôle suffisant et/ou nécessaire de tel ou tel neurone dans une fonction définie.

Ces dernières années ont vu les neurosciences comportementales gagner en popularité, comme peuvent en attester de nombreuses publications ne considérant que le comportement pour en dériver des hypothétiques circuits le contrôlant. Ces hypothèses peuvent être *ensuite* testées grâce à l'imagerie fonctionnelle et aux manipulations des circuits. Krakauer *et. al.* [35] rappellent ainsi l'importance d'une analyse expérimentale et théorique approfondie du comportement *en amont* de la recherche de l'implémentation en circuits fonctionnels, sans quoi il subsistera une incertitude sur le rôle d'un neurone donné : s'il est indispensable à la génération dudit comportement (nécessité) ou s'il en est responsable (causalité).

Le répertoire comportemental de la larve a donc l'immense avantage d'être très riche. Elle possède un certain nombre de réflexes : optomoteur [36, 37], optocinétique [38], optovestibulaire [39, 40] ou encore de maintien de la posture [41] et de fuite [42]. Elle est également capable de navigation orientée par un stimulus : lumière [43, 44, 45, 46, 47, 48],

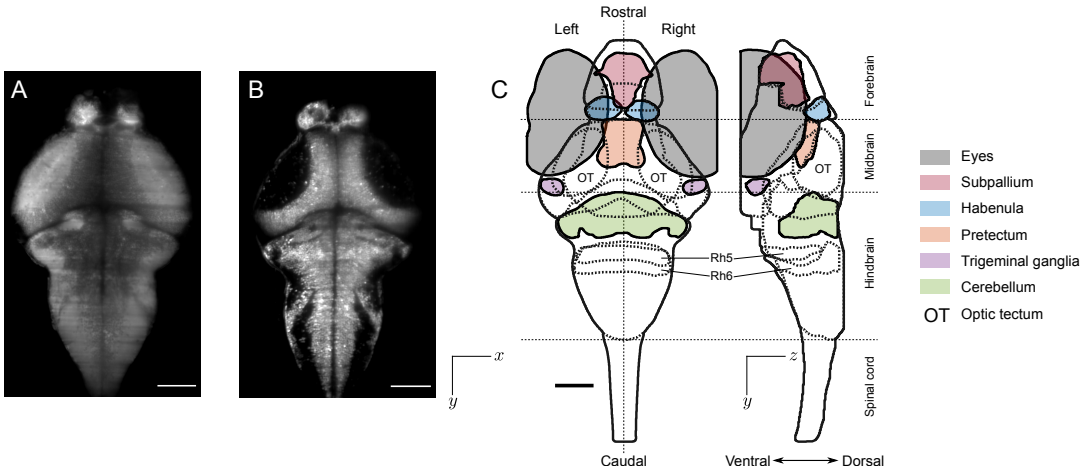


Fig. I.3 *Le cerveau de la larve de poisson-zèbre à 5 jours post-fécondation.* ***A-B*** *Image d'une couche du cerveau de la larve exprimant un rapporteur calcique dans le cytoplasme des neurones (**A**) et dans le noyau (**B**). Les grandes régions apparaissant en blanc dans **A** et en noir dans **B** correspondent aux neuropiles, des amas de terminaisons de neurones, n'apparaissant ainsi pas dans les lignées nucléaires.* ***C*** *Anatomie du cerveau, d'après l'atlas Z-Brain [30], avec quelques régions indiquées en couleurs. Barres d'échelle : 100µm.*

température [49, 50], composés chimiques [51, 52] ou encore alignement avec le courant d'eau [53, 54, 55, 56]. De plus, la larve de poisson-zèbre, dès 5-6 jours post-fécondation, chasse des organismes unicellulaires (des paramécies) [57, 58]. Enfin, l'adulte est également utilisé dans les études des comportements sociaux [59, 60].

Si les réponses réflexes suscitées par certaines stimulations sont très stéréotypées, suggérant une implémentation neuronale assez directe, d'autres montrent une certaine diversité d'animal à animal et même au sein d'un même individu, d'un essai à l'autre. Cela en fait potentiellement un bon modèle pour l'étude de la variabilité inter- et intra-individuelle : ayant accès à l'activité du cerveau dans sa globalité et à sa traduction comportementale, identifier les états du cerveau – à la fois comportementalement et neurologiquement – à l'origine de cette variabilité est possible [61].

I.3.2 Locomotion de la larve de poisson-zèbre

Les larves de poisson-zèbres ont une nage dite discrète. Leur navigation consiste en une série de battement de queue (quelques dizaines de hertz) durant une centaine de millisecondes [57], propulsant ainsi l'animal, dans une direction déterminée par l'angle

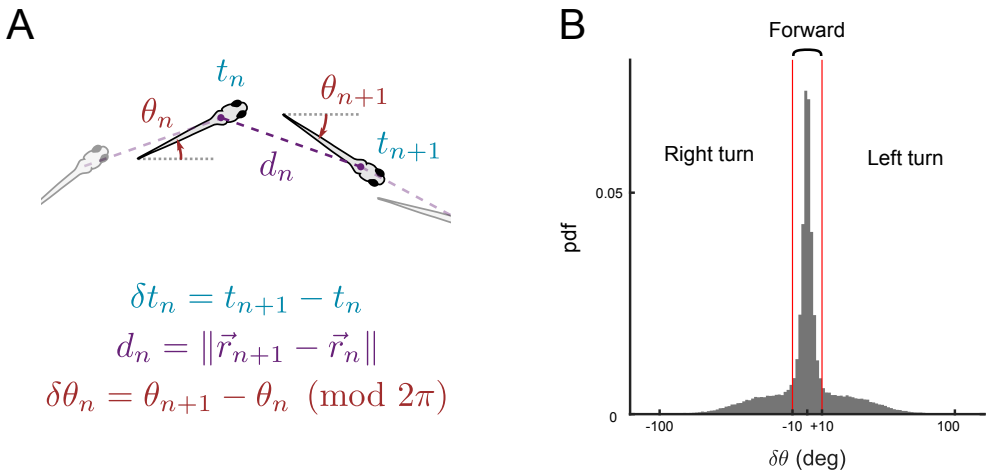


Fig. I.4 *Définition de trois paramètres cinématiques.* ***A*** *Schéma des mouvements discrets d'une larve de poisson-zèbre. δt : intervalle inter-mouvement, d : déplacement linéaire, $\delta\theta$: angle de réorientation.* ***B*** *Distribution typique des angles de réorientation $\delta\theta$. Le seuil de 10° définit trois types de battement : tournant à droite, tournant à gauche et tout-droit.*

de la queue, qui se laisse alors glisser jusqu'à arrêt total. Après un temps de repos, de l'ordre de la seconde [62], une nouvelle bouffée d'activité propulse le poisson à une nouvelle position, dans une nouvelle orientation.

C'est à ses poussées (*bout* en anglais) discontinues que nous allons nous intéresser. En effet, ce sont elles qui déterminent la dynamique de locomotion et de fait de l'exploration. Spécifiquement, on regarde les valeurs différentielles pre- et post-battement. Trois paramètres de base, représentés dans la figure I.4, peuvent être ainsi associés à chaque battement :

— le déplacement (linéaire), d, exprimé en millimètre, est la distance parcourue pendant le mouvement.
— l'angle de réorientation (ou déplacement angulaire), $\delta\theta$, exprimé en degré ou radian, quantifie le changement d'orientation de l'axe du corps du poisson.
— l'intervalle inter-battement (ou IBI pour *inter-bout interval*), δt est le temps passé immobile avant d'initier un mouvement.

L'angle de réorientation $\delta\theta$ contient plusieurs informations : son amplitude et son signe. Ce dernier définit la direction de la nage par rapport à l'animal : soit à droite, soit

à gauche. La réorientation a été étudiée en détail [44, 45, 63, 48] et il a été montré que la distribution des angles $\delta\theta$ réalisés par l'animal, dont un exemple est montré dans la figure I.4B, est une mixture de deux distributions centrées en 0, une étroite correspondante aux événements où le poisson va essentiellement tout droit et une plus large correspondante aux tournants, gauche ($\delta\theta < 0$) et droite ($\delta\theta > 0$). Pour classer ces événements, la distribution des valeurs absolues de $\delta\theta$ peut être ajustée par la somme d'une gaussienne (pour la partie centrale) et d'une fonction gamma (pour la partie large). L'intersection des deux, qui correspond à une valeur de 10°, définit le seuil au-delà duquel un mouvement est considéré comme un tournant. Finalement, chaque mouvement peut être catégorisé comme un mouvement tout droit, un tournant à gauche ou un tournant à droite. Cela permet de calculer la probabilité qu'a le poisson de tourner à chaque mouvement, définie comme la fraction des tournants sur l'ensemble des mouvements. Ce quatrième paramètre de base s'ajoute aux trois décrits ci-avant.

I.4 La température comme modalité sensorielle

La température joue un rôle de premier plan dans la cinétique de toutes les réactions chimiques [64] et notamment dans les processus biochimiques qui sous-tendent l'activité des neurones. Les organismes endothermes régulent par eux-même la température de leurs corps et stabilisent les réactions biochimiques, contrairement aux organismes dit ectothermes, dont font parti la quasi-totalité des poissons. L'implémentation de stratégies permettant d'éviter des température dommageables pour l'individu est alors crucial. Une courte revue des mécanismes de perception de la température et des connaissances sur l'effet de la température sur la larve de poisson-zèbre est présentée dans cette section.

I.4.1 Perception de la température

La perception du toucher, de la température et de certains composés chimiques est médiée par des canaux ioniques, dits TRP (*transient receptor potential*). On les retrouve dans de nombreuses cellules, animales ou non [65].

Ceux présents à la surface des terminaisons de neurones spécialisés sont notamment chargés de la transduction, *i.e.* la traduction d'une stimulation externe en signal électrique traité par le cerveau. Un type de canal TRP, les TRPV (V pour vanilloïde) sont sensibles à la température [66]. Les cellules portant ces canaux projettent principalement dans les ganglions trigéminaux et dans le ganglion spinal, des amas de neurones situés à la périphérie du système nerveux [66]. Ce ne sont pas les seuls canaux sensibles à la chaleur : les canaux TRPA, impliqués dans la nociception, peuvent également activer les neurones qui en sont dotés [67], comme chez la mouche par exemple. Chez les mammifères, il a été

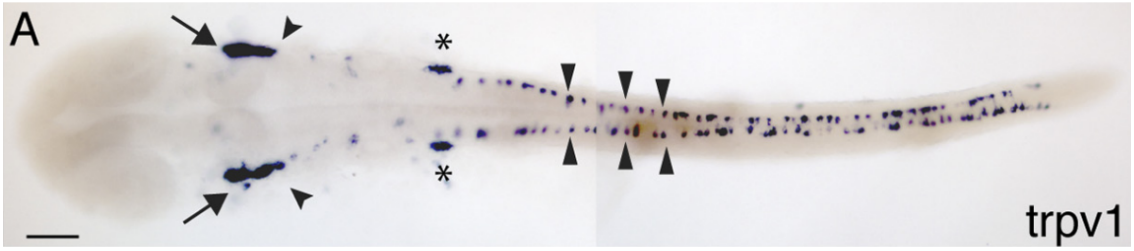


Fig. I.5 *Localisation du gène exprimant le canal ionique TRPV1 impliqué dans la thermotransduction chez la larve de poisson-zèbre à 24 heures post-fécondation. De gauche à droite, flèches : ganglions trigéminaux. Têtes de flèche : ganglions de la ligne latérale supérieure. Étoiles : ganglions de la ligne latérale inférieure. Têtes de flèche plates : cellules de Rohon-Beard. Barre d'échelle : 100μm. Tiré de [70].*

montré que d'autre types de canaux TRP (TRPM8 ou CMR1) sont responsables de la transduction de stimulations froides [68, 69].

Chez le poisson-zèbre, seuls les canaux TRPV1 et TRPV2 ont été identifiés comme impliqués dans la sensation de chaleur [70] et pas les canaux TRPA [71]. Ils sont exprimés dans les cellules projetant dans les ganglions trigéminaux et ceux de la ligne latérale postérieure et inférieure (au niveau de la queue) et dans les cellules sensorielles de Rohon-Beard [70], voir figure I.5. La réponse des canaux TRPV1 à une augmentation de la température est montrée en figure I.6. La réponse est linéaire avec la température, suggérant que les cellules exprimant TRPV1 agissent comme un thermomètre pour l'organisme.

À ma connaissance, le mécanisme de perception du froid chez le poisson-zèbre n'a pas été élucidé. En effet, le poisson-zèbre ne possède aucun gène analogue à celui responsable du canal TRPM8 [72]. Néanmoins, le menthol, un agoniste de TRPM8, provoque une vive activité motrice chez le poisson-zèbre [73], suivie d'une anesthésie, un effet également observé lorsque les larves sont placées sur de la glace. Les auteurs indiquent que la bouffée d'activité précédant l'anesthésie suggère que les canaux TRPA1, responsables de la nociception, sont impliqués.

I.4.2 Intégration de la température chez la larve de poisson-zèbre

La température fait partie des modalités sensorielles les moins étudiées chez la larve de poisson-zèbre en neurosciences. L'étude de l'effet de la température sur la navigation est relativement récente. Une première initiative, menée par D. N. Robson dans sa thèse en 2013 [49], avait pour but de décrire la locomotion de la larve dans un gradient de température, à la manière de ce qui a pu être fait chez la mouche ou chez le vers rond *C.*

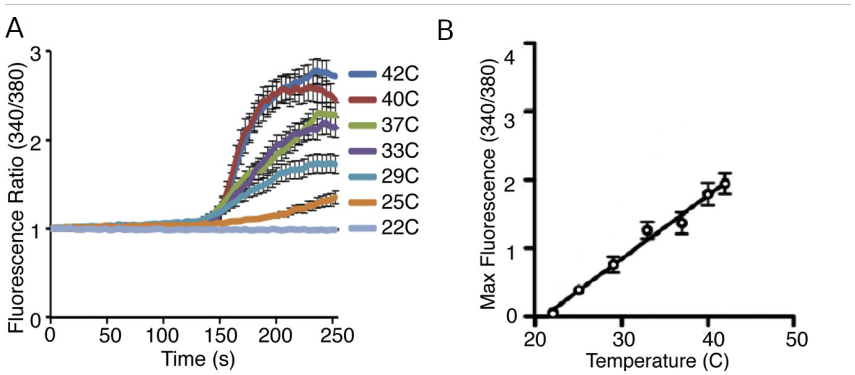


Fig. I.6 *Les canaux TRPV1 sont activés par la chaleur.* ***A*** *Réponses moyennes des neurones exprimant trpv1 à une rampe de température (non montrée), de 22°C à la température indiquée à droite en une minute. Les traces suivent de près la température.* ***B*** *Réponse maximale moyenne en fonction de la température. Tiré de [70].*

elegans [74].

Son expérience consistait en un bassin circulaire en aluminium de 15cm de diamètre avec 2.5mm d'épaisseur d'eau, posé sur des éléments chauffants. Un gradient de température est établi, entre 37°C aux bords et 25°C au centre, soit un gradient de 0.16°C/mm. Un poisson est introduit dans le bassin et une plaque est placée au dessus pour limiter l'évaporation. Un total de 20 poissons ont subi un protocole de 30 minutes de condition à température homogène (*baseline*) à 25°C puis 30 minutes pendant le gradient décrit ci-dessus. L'analyse consiste ensuite à déterminer l'effet de la température absolue et du gradient local de température sur les paramètres cinématiques décrits en section I.3.2. Une synthèse des résultats est présentées en figure I.7.

On peut résumer ces données de la façon suivante : les larves de poisson-zèbres évitent les températures supérieures à 30°C. Une haute température implique de plus grandes réorientations, de plus grands déplacements et des mouvements plus fréquents. Le gradient ressenti au mouvement précédent n'impacte pas l'intervalle inter-mouvement mais conduit à un déplacement plus important (quel que soit le signe du gradient). Un gradient positif induit une réorientation plus importante tandis qu'un gradient négatif réduit cette amplitude de réorientation.
Une autre expérience dans laquelle la larve est soumise à de lentes variations temporelles de température montre que ces modulations sont conservées, suggérant une stratégie temporelle.

M. Haesemeyer *et. al.* (2015) [50] ont conduit une série d'expériences dans lesquelles une larve est directement chauffée par un laser infra-rouge (figure I.8A). On sort ici du

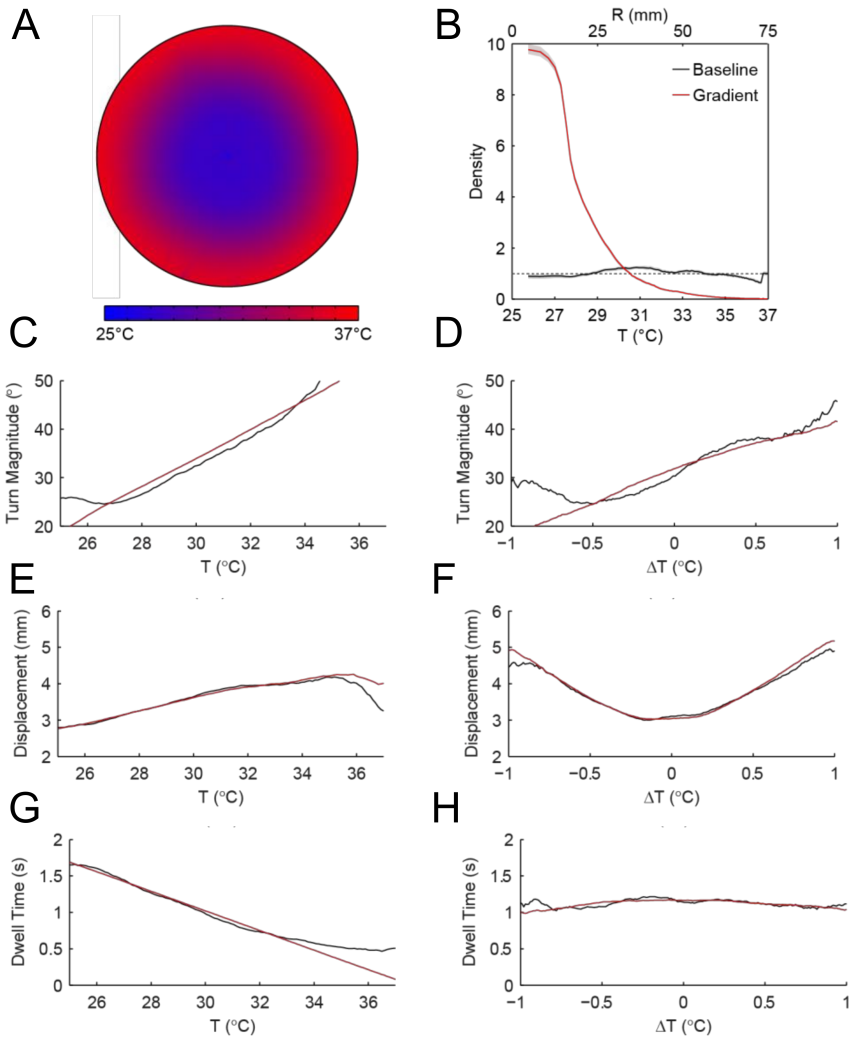


Fig. I.7 *Effet de la température sur les paramètres cinématiques de la larve de poisson-zèbre.* ***A*** *Gradient thermique dans un bassin de 15cm de diamètre.* ***B*** *Densité de présence pendant la condition de base (noir) et pendant le gradient (rouge).* ***C-H*** *Impact de la température (**C,E,G**) et du gradient ressenti pendant le mouvement précédent (**D,F,H**) sur les paramètres de navigation :* ***C-D*** *Réorientation,* ***E-F*** *Déplacement et* ***G-H*** *intervalle inter-battement. Les lignes noires sont obtenue par estimation par noyau (KDE) et les lignes rouges sont le résultat d'une régression. Tiré de [49].*

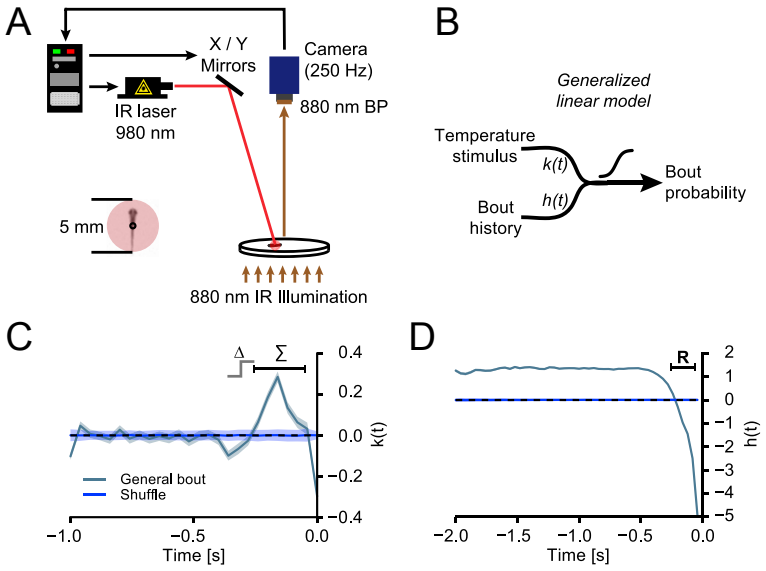


Fig. I.8 *Structure de la perception de la température chez la larve de poisson-zèbre.* ***A*** *Dispositif expérimental. La larve est suivie et chauffée par un laser infrarouge.* ***B*** *Schéma du modèle linéaire généralisé. Le modèle trouve les filtres $k(t)$ et $h(t)$ associés respectivement à la température et à l'historique des mouvements pour prédire la génération d'un mouvement.* ***C*** *Filtre associé à la température, $k(t)$. Il est non nul 400ms avant la génération du mouvement. Δ : partie associée au calcul d'une dérivée (gradient de température). Σ : partie associée au calcul d'une intégrale (détermination de la température absolue).* ***D*** *Filtre associé à l'historique des mouvements. R indique la période réfractaire. Tiré de [50]*

cadre physiologique pour permettre des paradigmes plus flexibles. Un gradient virtuel, où la température induite par le laser augmente à mesure que le poisson s'éloigne du centre d'une boîte de Pétri, confirme que le poisson évite les zones où la température est trop élevée. Les auteurs appliquent ensuite un bruit blanc de température à la larve de poisson-zèbre. À l'aide d'un modèle linéaire généralisé (GLM) prenant en compte la stimulation et le moment où a eu lieu le dernier battement (figure I.8B), une paire de filtres associés à la température (figure I.8C) et à l'historique des battements (figure I.8D) permet de prédire la génération d'un mouvement. Les auteurs en déduisent qu'avant la génération d'un battement, la larve intègre l'information thermique dans une fenêtre de temps de 400ms durant laquelle la variation (dérivée) et la température absolue (intégration) sont prises en compte. L'augmentation des coefficients du filtre pendant l'intégration indique

une augmentation de la probabilité de générer un mouvement avec la température. Le filtre associé à l'historique de navigation présente une période réfractaire (figure I.8D), indiquant que la probabilité d'initier un mouvement est dépendante du temps auquel a eu lieu le précédent. Finalement, ces résultats confirment que le poisson intègre à la fois la température absolue et le gradient de température, tout en précisant la structure temporelle de ce processus.

Les auteurs ont utilisé cette même technique de stimulation thermique sur une larve partiellement immobilisée pour y combiner l'imagerie calcique fonctionnelle [75] et l'enregistrement des mouvements de la queue (figure I.9). À partir des enregistrements de l'activité des neurones et de la sortie moteur (les mouvements de queue), deux types de cellules sont identifiées : celle liées seulement à la génération du mouvement et celles répondant à la température. Celles-ci sont groupées en deux sous-populations : celles répondant à l'augmentation de la température (ON) et celles répondant à sa diminution (OFF). Les cellules corrélées uniquement avec les mouvements de queue sont également groupées par type (quatre au total). Enfin, les mouvements de queues sont séparées en deux catégories.

Un cluster de neurones répondants à la chaleur a été identifié dans les rhombomères 5 et 6, une région connue pour recevoir les projections des ganglions trigéminaux [76]. Un modèle à 4 étapes est ensuite construit (figure I.9C), contraint par l'activité neuronale observée. Premièrement, la température est utilisée pour construire un modèle de la réponse des neurones des ganglions trigéminaux. Le résultat de ce modèle est ensuite utilisé pour construire celui prédisant l'activité des différents types de cellules identifiées dans les rhombomères 5/6. De nouveau, celui-ci est utilisé pour modéliser la réponse des neurones impliqués dans les mouvements de queue. Dernière étape, la trace de ces derniers neurones permet de prédire le type de mouvement de queue généré. L'ensemble de ce modèle dynamique capture correctement la génération de mouvements évoqués par la température. Il semble robuste : il prédit correctement les mouvements induits par un protocole de stimulation différent.

Cette étude, qui se concentre sur un groupe de neurones relativement restreint (en moyenne 40 neurones par individu) des rhombomères 5/6, note également que les neurones sensibles à la température sont dispersés à travers l'ensemble du cerveau (figure I.9B). Le modèle développé ici semble capturer efficacement les possibles transformations que subit le signal thermique pour générer un comportement, cependant, il n'est pas exclu que les autres cellules non considérées jouent directement un rôle dans la sortie moteur, par exemple dans la direction de nage. Il n'est pas non plus exclu que ces autres cellules participent à des processus de plus haut niveau, modulant par exemple certains circuits qui, ensemble, définissent l'état interne de l'animal. De plus, seule des stimulations "chau-

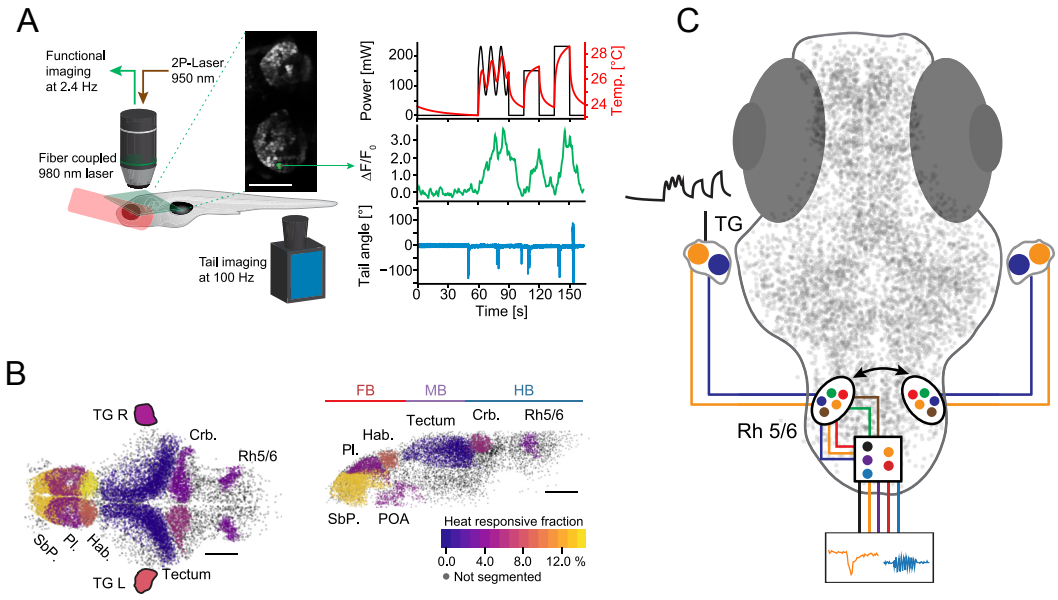


Fig. I.9 *Imagerie fonctionnelle pendant une stimulation thermique.* ***A*** *Dispositif expérimental. (Gauche) Un microscope 2-photon enregistre l'activité neuronale d'une large fraction du cerveau d'une larve de poisson-zèbre recevant une stimulation thermique délivrée par un laser infrarouge tout en enregistrant les mouvements de la queue libérée. (Droite, de haut en bas) La commande du laser (noire) et la température mesurée résultante (rouge), des exemples de traces calciques (vert, milieu) et du mouvement dans la queue (bleue, bas).* ***B*** *Fraction de neurones dans les régions indiquées répondant à la température. Le code couleur indique le pourcentage de neurones répondant dans une région donnée. TG : ganglion trigéminaux, SbP : subpallium, Pl : pallium, Crb. : cerebellum (cervelet), Rh5/6 : rhombomères 5/6, POA : aire préoptique. FB : prosencéphale (forebrain), MB : mésencéphale (midbrain), HB : rhombencépahale (hindbrain).* ***C*** *Circuit dynamique de transformation du signal thermique prédisant la sortie moteur. Les couleurs de chaque étape du circuit définit un type de réponse neuronale. Tiré de [75].*

des" sont employées. Si cette étude est un jalon important dans l'étude des circuits de la perception de la chaleur, il reste des pans entiers à élucider dans ce processus. Spécifiquement, comment la modulation de l'activité de groupes de neurones par la température permet au poisson de générer des comportements adéquats, orienté vers un but, reste évasif. Plus généralement, la température semble impacter le cerveau dans son ensemble et a de fait probablement un impact sur l'état interne de l'organisme.

La compréhension des stratégies gérées par les circuits neuronaux ne pourra se faire qu'en analysant quantitativement et systématiquement l'effet de la température sur le comportement de la larve et sur l'activité cérébrale. C'est une contribution à cet effort que propose ce manuscrit. Dans une première partie, une voie différente est explorée pour imposer à l'animal une stimulation thermique contrôlée et s'intéresse à la reproduction des précédents résultats dans un contexte étendu aux températures froides. La deuxième partie explore plus en détail le "simple" effet de la température sur les statistiques de locomotion et sur la dynamique d'un circuit neuronal contrôlant la direction de la nage, en l'absence d'information différentielle (sans gradient).

Chapitre II

Gradient et stimulation thermiques

II.1 Comportement dans un gradient

II.1.1 Dispositif expérimental

a) Bassin et éclairage

La cuve dans laquelle les expériences ont été menées a été fabriquée en cuivre afin de maximiser la conductivité thermique. Les dimensions ont été choisies afin de minimiser le temps d'établissement de la température, en évitant la convection et sans gêner la nage des poissons. On a choisi une cuve de 100mm par 45mm avec une profondeur de 2.5mm. La hauteur d'eau est augmentée à 4.5mm grâce à des espaceurs de 2mm d'épaisseur sur lesquels on pose une plaque de PMMA qui limite l'évaporation. Ce bloc de cuivre est peint en noir avec une peinture biocompatible pour éviter la libération d'ions cuivre, nocifs pour la larve [77], et pour améliorer le contraste observé à la caméra. La cuve est attachée à deux modules Peltier de 78W, placés à chacune des extrémités, avec du ruban adhésif thermique assurant un meilleur transfert de chaleur. Une caméra et sa lentille macro sont attachées via une potence à une hauteur suffisante pour que la région d'intérêt figure en entier sur l'image captée. Le dispositif est filmé à 25 images par seconde. L'ensemble, représenté en figure II.1, est placé sous un drap noir pour empêcher la lumière environnante de pénétrer.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un éclairage issu de deux LED infrarouges auxquelles la larve de poisson-zèbre est insensible [78] pour empêcher tout biais visuel dans notre protocole. Cette méthode présente deux inconvénients majeurs. Le premier est d'ordre technique : la cuve étant opaque, il est impossible d'éclairer par en dessous, ce qui offre le meilleur contraste possible. Nous avons opté pour un éclairage le plus rasant possible, mais le contraste s'en est retrouvé sévèrement impacté. De plus, chaque individu produit plusieurs ombres autour, ce qui complique grandement la procédure

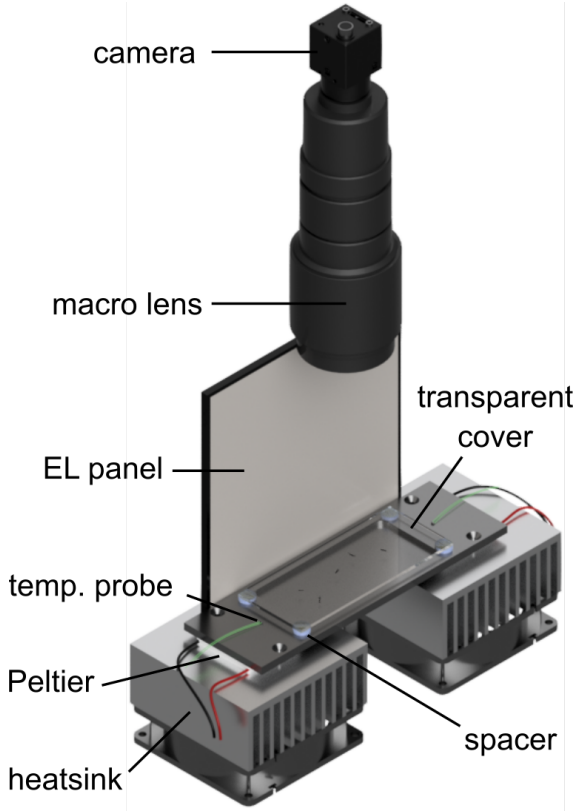


Fig. II.1 *Schéma du dispositif expérimental. La pièce en cuivre mesure 190mm par 60mm, la partie extrudée (le bassin) 100mm par 45mm.*

de suivi de chaque objet (*tracking*, voir section II.1.2). Le deuxième inconvénient est d'ordre physiologique : les larves de poisson-zèbre sont moins actives dans le noir, même après une dizaine de minutes d'habituation. Toutes les statistiques de nage seraient ainsi biaisées, le poisson n'étant pas vraiment dans une phase d'exploration. Nous avons donc décidé de travailler avec une illumination uniforme blanche, générée grâce à une dalle électroluminescente qui émet une lumière uniforme depuis une grande surface. Celle-ci est placée d'un côté de la cuve, et pour limiter le biais vers cette source lumineuse, un miroir est placé en face. Même s'il peut subsister un biais phototactique, ce dernier serait dans la direction orthogonale à celle du gradient thermique établi par les deux modules Peltier.

Pour s'assurer de la non-nocivité du système, notamment de la peinture, des conditions assez fermées et de la faible hauteur d'eau comparée à ce que l'on trouve dans une boite de Pétri classique (10mm), des larves sont laissées plus de 12h dans la cuve, en condition d'expériences, c'est à dire avec lumière et plaque de PMMA. Tous les individus ont survécu et nageaient qualitativement normalement.

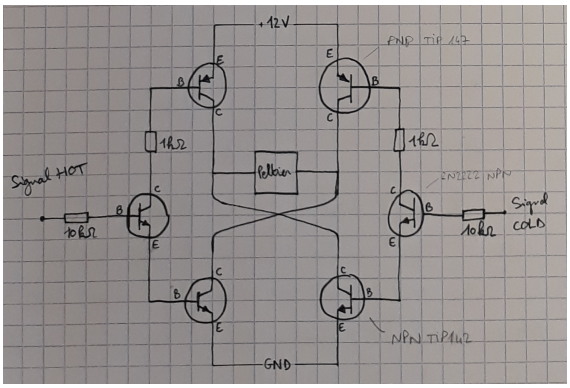


Fig. II.2 *Schéma d'un pont en H. Le module Peltier au centre est alimenté par 12V. NPN et PNP sont deux types de transistors. Signal Cold et Hot correspondent aux signaux modulés envoyés par la carte Arduino. Schéma réalisé par R. Candelier.*

b) Contrôle de la température

Un module de Peltier est un dispositif permettant de chauffer et refroidir une surface grâce à l'effet du même nom. Il est composé de deux plaque de céramique enfermant une série de semi-conducteurs traversés par un courant électrique. Le signe de la tension appliquée entre les deux bornes du module détermine quelle face chauffe et quelle face refroidit. Cela en fait un candidat de choix pour les applications où l'on veut facilement chauffer ou refroidir, la puissance de la chaleur dégagée (positive ou négative) étant proportionnelle à la puissance électrique fournie au module. Ici, la face d'intêret est celle qui est du côté de la cuve, de l'autre, on place un ventirad pour extraire la chaleur produite et permettre une réduction de l'effet Joule qui décroît l'efficacité du module.

Ainsi, on peut assimiler le module à un moteur dont on veut régler la vitesse de rotation (puissance de chauffe/refroidissement) et son sens (chauffer ou refroidir). Un circuit standard d'électronique de puissance permettant de contrôler un moteur est le pont en H. Ce dernier comporte 4 commutateurs (transistors), qui, lorsqu'ils sont ouverts deux à deux, permettent au courant de passer dans un sens ou l'autre (figure II.2).

Grâce à ce circuit, il est également possible de moduler la puissance délivrée de manière numérique, grâce à deux transistors supplémentaires placés à chaque entrée du circuit, par modulation de largeur d'impulsion (*pulse width modulation*, PWM). En utilisant un micro-contrôleur qui comporte plusieurs sorties permettant la PWM, on dispose d'un contrôleur des modules Peltier permettant de régler si l'on chauffe ou l'on refroidit (la face d'intérêt) et sa puissance : on peut ainsi régler la température.

Pour ce faire, il faut encore savoir quelle puissance délivrer au Peltier, c'est à dire dé-

terminer quelle fréquence de PWM appliquer au pont en H. Dans un un premier temps, il faut connaître la température au niveau de la cuve de cuivre, au dessus des modules Peltier. Nous utilisons donc deux thermocouples type K, qui sont des sondes de température basées sur un autre effet thermoélectrique, l'effet Seebeck. Ce dernier se manifeste sous la forme d'une tension électrique entre deux jonctions de matériaux spécifiques placées à deux températures différentes. En connaissant la température de la jonction de référence (jonction froide), on peut calculer la température de la température au point de mesure. Cela peut être fait grâce à un amplificateur de thermocouple (Adafruit MAX31856), doté d'une thermistance pour mesurer la température de référence et qui est relié à une carte Arduino dont le micrologiciel convertit la tension enregistrée en température.

Nous pouvons donc maintenant mesurer la température aux deux bords de la cuve et moduler la puissance de chauffe des éléments Peltier. Pour déterminer cette dernière, nous avons implémenté un régulateur PID (proportionnel, intégral, dérivé) avec la carte Arduino. Un régulateur PID est une boucle de rétroaction qui calcule la commande $C(t)$ envoyée aux Peltier à partir d'un signal d'erreur $e(t)$ selon la formule suivante :

$$C(t) = Pe(t) + I \int e(t)dt + D\frac{de(t)}{dt}$$

où P, I et D sont trois coefficients qui sont déterminés empiriquement. Le terme proportionnel (P) permet d'atteindre grossièrement la commande, le terme intégral (I) permet de corriger l'éventuel écart et de réduire l'amplitude des oscillations et le terme dérivatif (D) permet une correction rapide en cas de perturbation ponctuelle du système. Ici, le signal d'erreur est la différence entre la température mesurée et la température de commande. La commande correspond à la fréquence de PWM, c'est à dire le ratio du temps passé dans l'état "allumé" et "éteint". Ce dispositif permet ainsi d'asservir la température aux deux bords de la cuve à deux températures cibles.

Le tout, c'est à dire la mesure de la température des deux côtés de la cuve, l'entrée des coefficients P, I, D et des températures de commande, ainsi que la visualisation des images capturées par la caméra se fait *via* une interface graphique (UI) développée sur mesure en C++ grâce à l'environnement de développement (*framework*) Qt. L'intensité lumineuse de la dalle électroluminescente est quant à elle gérée par un contrôleur commercial.

Les coefficients P, I, D sont choisis par essais et erreurs en regardant la réponse en température à un créneau dans la commande. On optimise tour à tour les trois coefficients pour minimiser le temps d'établissement des températures et l'amplitude des oscillations autour de la température de commande, qu'on cherche à maintenir sous les 0.2°C. Par diffusion, dans le cas d'un conducteur thermique (la cuve en cuivre) placé entre deux thermostats (les deux modules Peltier), après un temps qui dépend de la diffusivité thermique

du cuivre, la température le long du conducteur est :

$$T(x) = \frac{T_L - T_R}{x_L - x_R}x + \frac{T_R x_L - T_L x_R}{x_L - x_R}$$

avec x_i la coordonnées x du côté i (gauche L ou droite R) et T_i la température du Peltier i (L ou R). On prendra ici $x_L = 0$ et $x_R = L$ avec $L = 100mm$. On a ainsi un gradient linéaire entre les deux bords du bassin.
On peut regarder la dynamique d'établissement de la température dans la cuve en cuivre, grâce à la loi de Fourier à une dimension :

$$D\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} = \frac{\partial T}{\partial t}$$

où D est le coefficient de diffusivité thermique qui vaut $117 \times 10^{-6} m^2 s^{-1}$ pour le cuivre. Par analyse dimensionnelle, on peut estimer l'ordre de grandeur de la constante de temps du système par $\tau \sim L^2/D$. Pour notre système, la température s'établit pendant un temps de l'ordre de la seconde. La cuve sera donc considérée comme un thermostat pour l'eau qu'elle contient.
En plaçant une troisième sonde de température, on peut contrôler l'évolution de la température de l'eau au milieu de la cuve. Après 5 minutes à 22°C, on impose 18 et 33°C à gauche et à droite respectivement. La réponse en température de l'eau est représentée dans la figure II.3. On mesure une latence d'environ 4 minutes avant que la température attendue (entre 18°C et 33°C, la température au milieu devrait être 25.5°C, voir équation b)) soit atteinte.

Tous les outils sont en place pour enregistrer le comportement de larves de poisson-zèbre sous différentes conditions de température. On verra dans la prochaine section les protocoles utilisés pour sonder les caractéristiques de la nage du poisson dans un gradient de température, avant d'aborder en détail l'analyse des films enregistrés par le dispositif expérimental.

c) Protocole expérimental

Le bassin est rempli de milieu embryonnaire (E3, un mélange d'eau distillée et de sels minéraux utilisé pour l'élevage des larves). La température est fixée à 22°C des deux côtés, pour avoir un milieu thermiquement homogène. Dix larves âgées de 5 à 7 jours post-fécondation sont transférées de leur boîte de Pétri d'élevage au bassin expérimental. Notons que l'on peut se permettre de mettre dix animaux, l'encombrement stérique étant minimal au vu du volume d'eau, et il a été montré qu'il n'existe pas de comportement collectif à cet âge [79, 80, 81]. La plaque de PMMA est placée au dessus, l'éclairage allumé et les rideaux fermés. Dix minutes avant le début du protocole sont nécessaires pour que

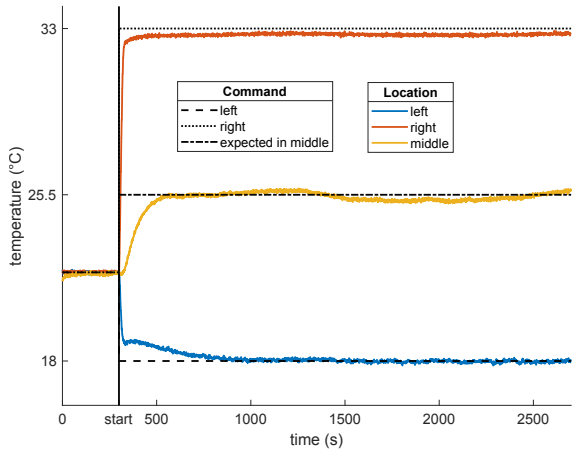


Fig. II.3 *Évolution de la température au centre du bassin (courbe jaune, middle) lors de l'établissement d'un gradient. En bleu (rouge), la température du cuivre au bord gauche (droit, respectivement). En tirets et pointillés noirs, les températures de commande. La barre verticale (start) à 5min indique le début de la commande.*

les larves s'habituent à leur nouveau milieu. On lance ensuite l'enregistrement, pendant 5 minutes en condition homogène qui est notre contrôle.

Le gradient est ensuite imposé. On choisit une différence de température de 15°C, de 18 à 33°C qui correspond à la plage de température que les larves peuvent supporter sans séquelle [82]. Cela correspond à un gradient de $0.15°C/mm$. Le sens du gradient, c'est à dire quel côté est à 18°C et quel côté est à 33°C est déterminé aléatoirement. L'enregistrement continue pendant 40 minutes après le début de l'établissement du gradient. L'expérience dure au total 45 minutes, dont 5 minutes de ligne de base et 35 minutes de gradient effectif, en laissant 5 minutes pour que le gradient s'établisse. Le film, enregistré à 25 images par seconde, contient environ 67500 images et est exporté pour une analyse ultérieure.

II.1.2 Méthodes d'analyse

Cette section détaille la façon dont sont analysés les films dans un premier temps, et les paramètres cinématiques qu'on peut extraire à partir des trajectoires des larves – indépendamment de la température.

a) *Tracking*

La première étape est d'extraire des quantités exploitables à partir des images, dont un exemple est montré en figure II.4. Pour cela, on procède à un suivi (*tracking*) de tous

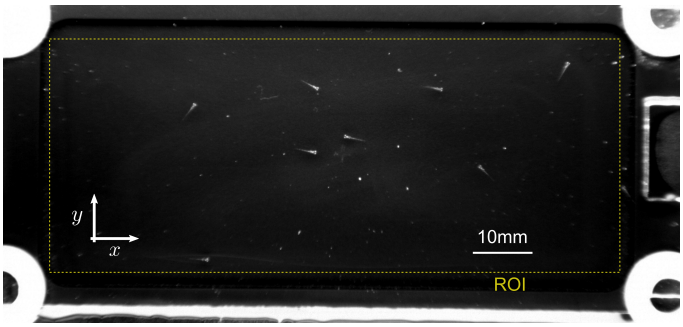


Fig. II.4 *Exemple d'image obtenue avec la caméra d'observation.*

les objets d'image en image. Dans notre projet, nous nous intéressons à la dynamique macroscopique de la nage, c'est à dire à des échelles de temps supérieures à la seconde sur lesquelles se déroule effectivement l'exploration. On ne s'intéresse donc pas à la structure fine, sub-seconde, du mouvement. En effet, pour se déplacer, la larve de poisson-zèbre bat de la queue à une fréquence de plusieurs dizaines de Hertz [57]. Ici, on ne s'intéressera qu'au mouvement résultant de ces battements de queue. Ainsi, chaque animal peut-être assimilé à un objet indéformable défini par ses coordonnées spatiales (x, y) et son orientation θ. Ce sont ces trois quantités que l'on va extraire pour chaque individu au cours du temps.

On utilise pour cela un logiciel de *tracking* développé au laboratoire par un doctorant, Benjamin Gallois, dénommé FastTrack [83]. Il s'agit d'une interface graphique intégrant une chaîne d'étapes permettant *in fine* d'obtenir un fichier contenant les coordonnées et orientations de tous les objets dans chaque image, en conservant leurs identités d'image en image.

Le processus de travail est illustré sur la figure II.5. La première étape consiste à définir une région d'intérêt (ROI, *region of interest*). On choisit un rectangle dont les côtés sont distants de 5mm des bords du bassin, car ces derniers biaiseraient inévitablement le mouvement des larves. Le logiciel créé ensuite une image de fond (*background*) en calculant l'image moyenne du film. Dans la suite, à chaque image sera soustraite cette image de fond. Ainsi, tous les éléments statiques disparaissent et seuls subsistent les objets mobiles qui nous intéressent. Un seuil d'intensité est ensuite choisi à la main afin de binariser les images. Une valeur de pixel en dessous de ce seuil est mis à 0 (noir), au dessus à 1 (blanc).

En fonction de la qualité des images, des opérations morphologiques peuvent être appliquées, telle que l'érosion (pour retirer les petits objets détectés qui sont essentiellement du bruit) et/ou la dilatation qui permet d'élargir les objets, regroupant ainsi les parties d'un même individu qui serait éventuellement suffisamment hétérogène en intensité pour qu'une partie de son corps passe en dessous du seuil.

Pour la première image, un identifiant différent est attribué à chaque objet détecté.

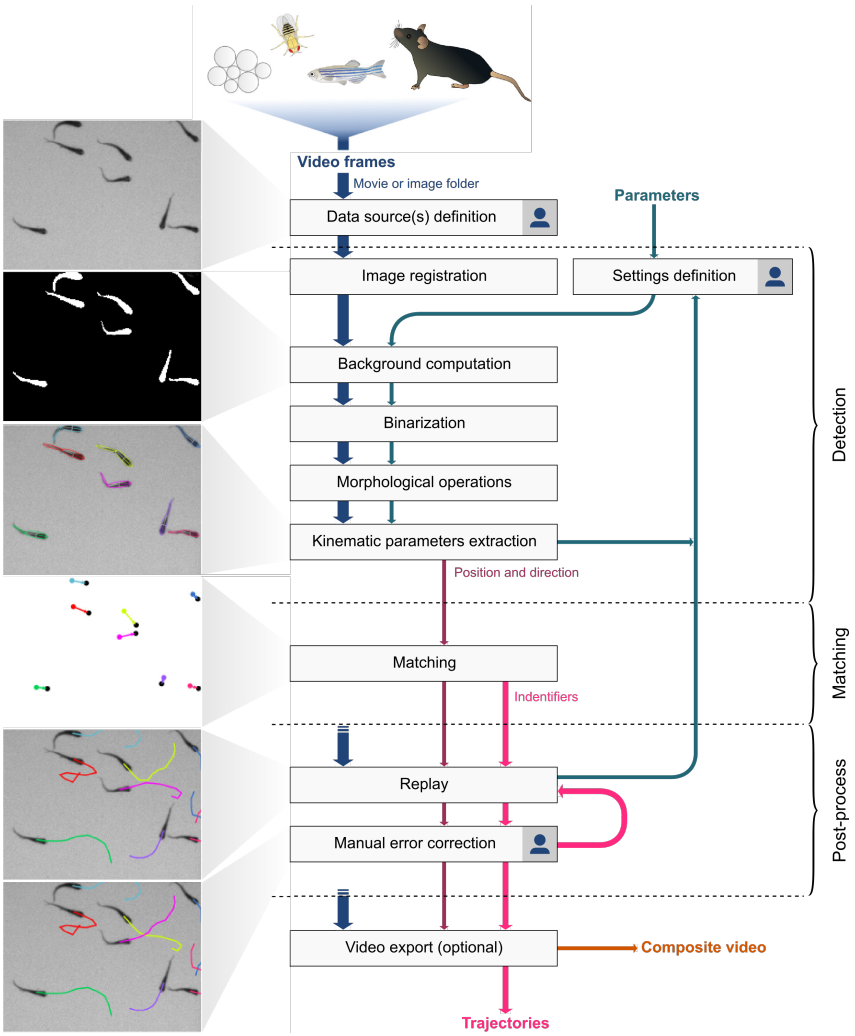


Fig. II.5 *Processus de travail de FastTrack. Tiré de [83].*

À l'image suivante, un algorithme permet de faire correspondre (*matching*) le bon identifiant aux objets, permettant ainsi de conserver, dans une certaine mesure, l'identité des individus d'une image à l'autre en minimisant une fonction de coût construite à partir de la position et de l'orientation de chaque objet. L'identité est "perdue" en cas d'occlusion de plusieurs objets ou si l'un quitte la ROI. À l'inverse, si un objet entre dans la ROI ou sort d'une occlusion, un nouvel identifiant unique est attribué au "nouvel" objet.

Notre jeu de données consiste ainsi en un fichier (un par expérience) qui contient des trajectoires. Une trajectoire est une séquence impliquant un unique animal, suivi d'un bord à l'autre. Pour chaque trajectoire, définie par son identifiant unique, on dispose de la position (x, y) et l'orientation θ de l'objet ainsi que les numéros des images correspondantes. Ces dernières sont horodatées, de manière à ce que l'on puisse reconstruire le

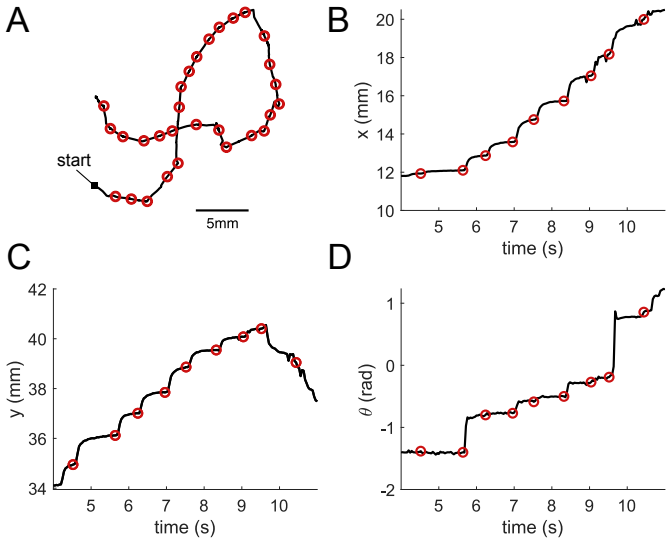


Fig. II.6 *Détection des mouvements. Les cercles rouges indiquent la position des battements.* ***A*** *Exemple de trajectoire issue de FastTrack, durant 26s.* ***B-D*** *Portions de traces temporelles correspondantes, commençant au 6e battement de la trajectoire, de la projection horizontale (*x*,* ***B****) et verticale (*y*,* ***C****) de la position et de l'orientation par rapport à l'axe horizontal (*θ*,* ***D****).*

vecteur temps.

b) Détection des mouvements et paramètres cinématiques

Pour détecter les mouvements de déplacement discrets décrits dans la section I.3.2, on utilise les traces temporelles des coordonnées x et y. On calcule le déplacement au carré de l'animal entre deux images, et on cherche les pics supérieurs à deux fois l'écart-type du vecteur déplacement. Nous imposons une distance temporelle de 0.4 seconde entre deux pics afin qu'un même événement ne puisse pas être considéré comme plusieurs. Ensuite, on filtre les pics ainsi trouvés sur des critères spatio-temporels déterminés empiriquement : la distance parcourue pendant un battement doit être comprise dans un intervalle donné (supérieur à 0.27mm et inférieur à 16mm) pendant une durée comprise dans un intervalle de temps donné (0.5s). Enfin, l'initiation du mouvement est marqué à deux tiers de la fenêtre de temps (0.17s) du pic de vitesse. Un exemple de trajectoire est montré sur la figure II.6A, avec les traces des coordonnées et de l'orientation au cours du temps.

À partir de ces battements et des traces x, y et θ, on peut calculer l'intervalle inter-battement δt, le déplacement d et la réorientation $\delta\theta$, définis dans la section I.3.2. Ces

battements permettent également de discrétiser le temps et de diminuer le poids donné aux individus immobiles.

II.1.3 Résultats

a) Température préférée

Dans un premier temps, on cherche à savoir si les larves de poisson-zèbre ont une température préférée. En effet, ceci n'est, à notre connaissance, pas connu. Si les larves sont élevées à 28°C, c'est pour optimiser leur vitesse de développement et non pour leur confort. À l'inverse de la lumière, pour laquelle on sait que les larves de poisson-zèbre ont une nage biaisée vers les régions les plus lumineuses (phototaxie, [44]), on ignore s'il existe effectivement une thermotaxie positive. Si les travaux de D. N. Robson [49] ont montré qu'une larve se concentre au milieu d'une bassin circulaire lorsque son centre est à 25°C et ses bords à 37°C, il est difficile de parler de préférence puisque l'animal n'a pas accès à une température inférieure à 25°C, qui correspond dans ses expériences au centre de l'arène. Avec notre protocole, l'animal a accès à toutes les températures qui ne lui sont pas nocives. On peut ainsi regarder la forme de la distribution des positions à la fin du gradient et la comparer à celle obtenue sous température uniforme (*baseline*).

Le protocole décrit dans la section II.1.1 (figure II.3) a été réalisé sur 10 lots de 10 poissons, pour un total de 100 individus différents. Pour rappel, il s'agit de 5 minutes de condition uniforme, puis un gradient de 18°C à 33°C est imposé pendant 40 minutes. On ignore les trajectoires ayant lieu pendant les 5 minutes suivant la commande du gradient pour que ce dernier s'établisse. Cinq expériences sont réalisées avec 18°C à gauche et 33°C à droite, les cinq autres avec le gradient dans le sens inverse.

Après avoir procédé au *tracking* de tous les films enregistrés, les données sont découpées en trajectoires. Pour ne pas donner trop de poids aux individus immobiles (si les larves de poisson-zèbre sont la plupart du temps actives et exploratrices, il arrive que certaines ne bougent plus pendant plusieurs minutes), on exclut des analyses les trajectoires contenant moins de 5 battements et durant moins de 5 secondes. En revanche, pour prendre en compte l'intervalle inter-battements, qui module le temps passé à chaque position, on utilise dans la suite les traces temporelles et non les traces discrétisées en battements.

On calcule, pour chaque expérience, la densité de probabilité de présence au sein du bassin pendant les conditions uniformes et on en tire la moyenne et l'erreur standard (écart-type divisé par la racine carrée du nombre d'échantillons, ici le nombre d'expériences, 10). Cela correspond à la courbe de noire de la figure II.7A. La même chose est faite sur la fin de chaque expérience. On choisit de regarder seulement les derniers 10% de

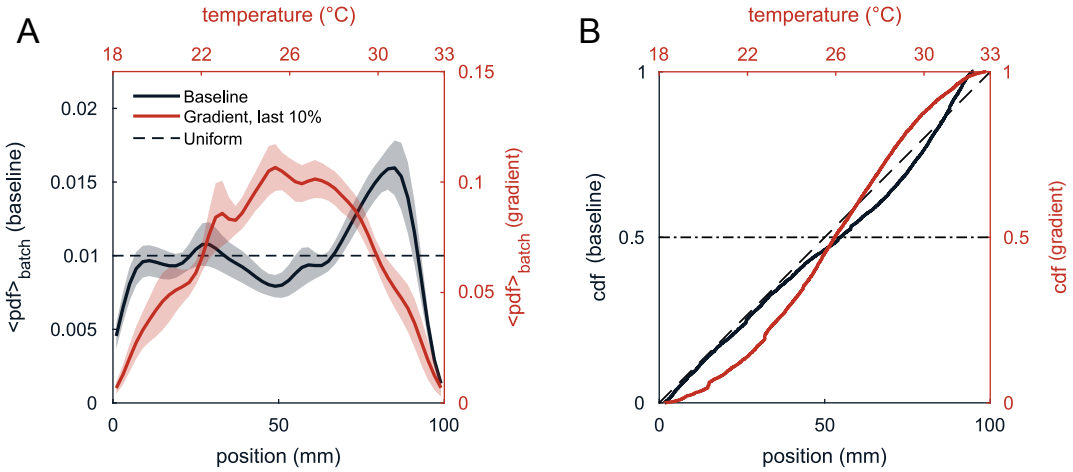


Fig. II.7 *Plage de température préférée.* ***A*** *Moyenne des densités de probabilité (pdf) de la position (convertie en température pendant le gradient) des individus pendant la condition de base (noir) et pendant les 10% finaux de la condition gradient (rouge). La zone ombragée correspond à l'erreur standard sur la moyenne. La ligne horizontale en tirets est la distribution attendue pour une répartition uniforme dans le bassin.* ***B*** *Fonction de répartition empirique de la position pendant la condition de base (noir) et de la température ressentie pendant les 10% finaux de la condition gradient (rouge). La légende est la même que dans le panneau* ***A****. La ligne pointillée horizontale indique la valeur médiane (cdf à 0.5).*

la durée de la condition gradient pour limiter les biais dûs à l'établissement du gradient. La courbe correspondante est tracée en rouge dans la figure II.7A.

On observe un biais non-négligeable du côté droit de la cuve pendant la condition de base, où la courbe dévie significativement de la distribution uniforme attendue (en tiret noir). On observe ce même biais sur la distribution cumulée (fonction de répartition) tracée dans la figure II.7B, en noir. Cela est probablement dû au fait que ces quantités sont calculées sur un temps relativement court. En effet, on verra dans un autre jeu de données qu'en utilisant le même dispositif mais sur une plus longue période, le biais n'est pas observé.

En présence d'un gradient thermique, les larves de poisson-zèbre semblent se confiner dans une plage de température entre 22 et 28°C. Les individus ne visitent les bandes au delà de cet intervalle que de façon marginale : cela indique une plage de température préférentielle. Le protocole utilisé s'avère néanmoins problématique : la plage de tempéra-

ture en question correspond au centre du bassin. Il aurait fallu tester différents gradients, décentrant la plage 22-28°C, ce qui n'a pas été fait dans ces conditions.

En revanche, on dispose de données préliminaires, enregistrées à titre de test du dispositif expérimental, dans le noir. Si la piètre qualité des images ne permet pas un *tracking* efficace, notamment pour la détection de l'orientation des animaux, il était néanmoins possible d'extraire la position des poissons. Le protocole consistait en 10 minutes de condition de base à 25°C puis un gradient de 20 à 30°C pendant 15 minutes. On dispose de 8 expériences à 10 ou 9 poissons dans chaque sens, pour un total de 16 expériences impliquant 150 poissons différents. On peut alors procéder de la même façon que précédemment, cependant, les expériences se déroulant dans le noir, certaines expériences ne donnent lieu qu'à peu de mouvements. Cela peut fausser l'estimation de la fonction de distribution et biaiser la moyenne de ces dernières. On préfère alors grouper toutes les données correspondantes à la condition de base d'une part ; celles correspondantes au gradient sont regroupées d'autre part. La densité de présence et la distribution cumulées sont alors estimées. Pour mesurer l'erreur, la technique de *bootstrap* est utilisée. Il s'agit d'une méthode de rééchantillonnage qui simule de nouveaux jeux de données à partir des données réelles sur lesquels on peut calculer la même quantité (ici, la distribution) et estimer la variabilité sous la forme d'intervalle de confiance (95%). Les distributions obtenues sont montrées en figure II.8.

Bien que les deux jeux de données ne soient pas directement comparables, notamment du fait de la différence d'éclairage (global blanc dans le premier cas, absent dans le second), on observe néanmoins un pic de présence situé sur la même plage de température, 22°C-28°C. La médiane est cependant légèrement moindre (25°C contre 26°C). Les poissons évitent toujours de manière systématique les températures supérieures à 30°C.

Concluons ainsi : la plage de température 22-28°C correspond à une zone de confort pour les larves de poisson-zèbre, avec une préférence moyenne située entre 25 et 26°C. Elles minimisent de manière robuste le temps passé dans les région où les températures sont inférieures à 20°C et supérieures à 30°C. Les larves, âgées de 5 à 7 jours, sont donc capables d'éviter les zones chaudes mais aussi froides. Dans la section suivante, on essaiera de voir comment cet organisme réalise cette thermotaxie.

b) Intégration du gradient

La plupart des organismes disposent d'un certain nombre de paramètres cinématiques qui sont modulés par les conditions extérieures, notamment la température. Les paramètres dirigeant la nage de la larve de poisson-zèbre ont été décrits dans la section II.1.2. Il s'agit de l'intervalle inter-mouvement, du déplacement et de l'amplitude de la réorien-

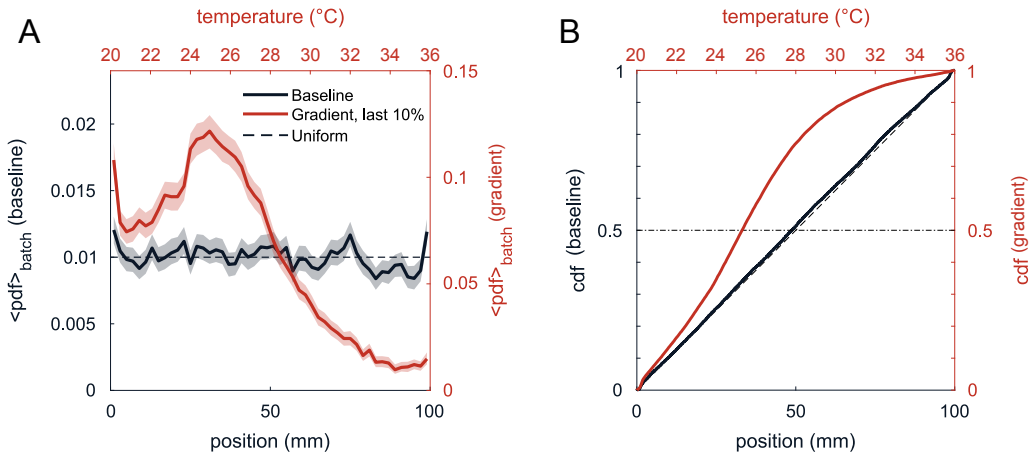


Fig. II.8 *Décalage du pic de densité de présence avec la température.* ***A*** *Densité de probabilité de présence (pdf) pendant la condition de base (noir) et pendant le gradient, convertie en température (rouge). Les zones ombragées correspondent à l'intervalle de confiance de 95% après bootstrap (1000 simulations). La ligne horizontale en tirets est la distribution uniforme attendue.* ***B*** *Distributions cumulées (cdf) correspondantes, les tirets correspondent à la cdf d'une distribution uniforme, la médiane est indiquée par la ligne horizontale pointillée noire.*

tation et de la probabilité de tourner. Dans la suite, on va étudier la façon dont la température absolue et le gradient de température impactent chacun de ces paramètres, après avoir expliquer de façon générique la méthode de représentation des résultats.

La méthode est la suivante : on compare systématiquement les paramètres pendant la condition de base et pendant le gradient. Les données provenant de toutes les expériences sont regroupées par condition, et les positions horizontales X (dans la direction du gradient) sont converties en température équivalentes d'après l'équation b), permettant la comparaison. Lorsqu'un gradient thermique est imposé, la composante horizontale du déplacement d'une larve, ΔX, correspond à un changement de température, ΔT. Ici, on impose une différence linéaire de température de 18 à 33°C sur une longueur de 100mm, correspondant à une pente de 0.15°C/mm. Le déplacement typique d'une larve est de 1-2mm [62, 84], soit un changement de température ressentie de 0.15-0.3°C, si la larve se déplace le long de la direction du gradient.

On fait donc correspondre à chaque mouvement i (1) la position X_i à laquelle le poisson est avant d'initier un mouvement, correspondant à une température T_i sous gradient, et (2) le changement de position ΔX_{i-1} pendant le mouvement précédent, correspondant à

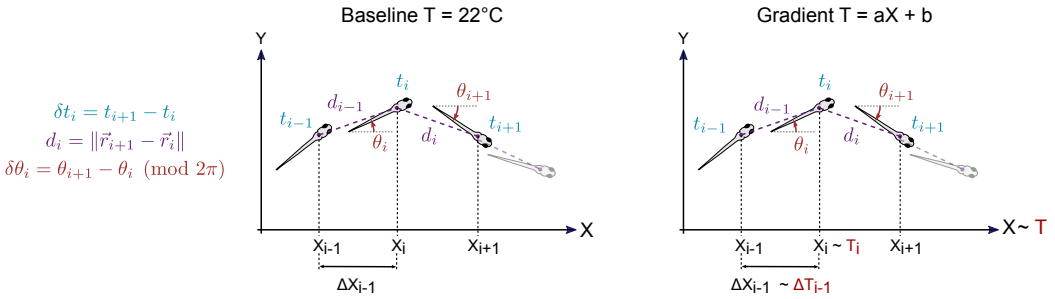


Fig. II.9 *Quantification de l'effet de la température sur les paramètres cinématiques. Gauche : définition des paramètres. Milieu : Schéma représentant l'évolution d'une larve sous température uniforme. À un mouvement correspond une distance d, dont la composante horizontale est notée ΔX. Droite : Schéma représentant l'évolution d'une larve sous un gradient thermique. Le gradient est selon l'axe X. La position du poisson X correspond à une température T et la composante horizontale (dans la direction du gradient) ΔX d'un déplacement d correspond à une différence de température ΔT.*

un gradient de température ΔT_{i-1} sous gradient. Dans la suite, on va regarder de manière systématique comment se comporte l'intervalle inter-battement δt_i, le déplacement linéaire d_i et l'amplitude de réorientation $|\delta\theta|_i$ en fonction de la température T_i et la différence de température ressentie au coup d'avant ΔT_{i-1}, tel qu'illustré dans la figure II.9. Ces paramètres sont à chaque fois comparés à leur équivalent sous température uniforme, X_i et ΔX_{i-1} à titre de contrôle. On fait ainsi les hypothèses que la température absolue ressentie par le poisson module les paramètres et que le gradient ressenti pendant un mouvement est intégré et modifie le mouvement suivant.

Pour vérifier ces hypothèses, on se place dans un premier temps dans l'espace discrétisé $(T, \Delta T)$ (ou son équivalent positionnel pendant la condition de base) et on regarde la moyenne du paramètre considéré dans chaque intervalle (*bin*) bidimensionnel $T, \Delta T$. On se concentre sur chacune des composantes : d'un côté, la température absolue, de l'autre, le gradient. Dans les deux cas, on discrétise les vecteurs T et ΔT en 100 bins (20 pour X et ΔX) contenant le même nombre d'éléments, et on trace la moyenne et l'erreur standard sur la moyenne de chaque bin. Cette opération correspond à la projection de la carte 2D, en moyennant tous les T ou tous les ΔT. On réalise la même procédure pour X et ΔX. Tout cela est montré dans les figures II.10-II.12, que l'on commentera ci-après.

b).1 Intervalle inter-mouvement Pendant la condition de base, la carte semble homogène (figure II.10A). Pendant le gradient, elle semble symétrique autour de l'axe $\Delta T = 0$ (figure II.10B). On note une diminution globale du délai d'inactivité entre deux mouvements (δt) à mesure que la température augmente, ce qui est confirmé dans la figure II.10C. L'intervalle diminue de façon quasiment linéaire quand la température augmente, passant d'un peu plus une seconde en moyenne à 18°C, jusqu'à 0.75s à 33°C.

Le gradient impacte aussi ce paramètre (figure II.10D). Une légère anti-corrélation entre l'intervalle inter-mouvement et le déplacement existe pendant la condition de base : un petit déplacement, identifié par un petit ΔX, a tendance à augmenter le temps passé à la nouvelle position. Pendant le gradient, cette anti-corrélation contribue probablement mais n'explique pas tout l'effet observé : on observe une claire diminution de l'intervalle inter-mouvement lorsque le poisson subit un changement de température, positif comme négatif, important. Cet intervalle passe d'environ 0.9s pour des changements de l'ordre de 0.2°C à 0.8s pour des changements supérieurs à 0.3°C. Une température élevée et un large changement de température au mouvement précédent conduisent donc la larve à nager plus souvent.

b).2 Déplacement La carte pour le déplacement d n'est pas homogène dans la condition de base (figure II.11A). En effet, il existe une bande horizontale située entre $\Delta X = -1$ et $\Delta X = +1$ mm, uniforme sur la longueur du bassin. Cela indique une autocorrélation positive du déplacement d'un mouvement au mouvement suivant : lorsque le poisson parcourt une grande distance, il est plus à même de faire à nouveau une grande distance au mouvement suivant. Cet effet est néanmoins exacerbé pendant le gradient (figure II.11B). On note également une augmentation globale du déplacement avec la température, ce qui est confirmée dans la figure II.11C, alors qu'il reste stable pendant la condition de base.

Bien qu'il y ait une autocorrélation positive des déplacements consécutifs non négligeable, la modulation de ce dernier due à la variation de température est sans commune mesure. Le déplacement augmente en effet d'un facteur deux lors d'un changement de température de l'ordre de 0.6°C.

Le déplacement augmente avec la température. De plus un changement de température, que ce soit une augmentation ou une diminution, induit une augmentation du déplacement, indiquant là encore que le signal thermique est traité et transformé.

b).3 Réorientation L'amplitude de la réorientation (la valeur absolue de la différence d'angle entre deux mouvements) quantifie de combien l'animal tourne pendant un mouvement. Une faible valeur indique que le poisson va plutôt tout droit, une valeur élevée indique qu'il se réoriente. Le signe de la réorientation renseigne sur la direction, droite

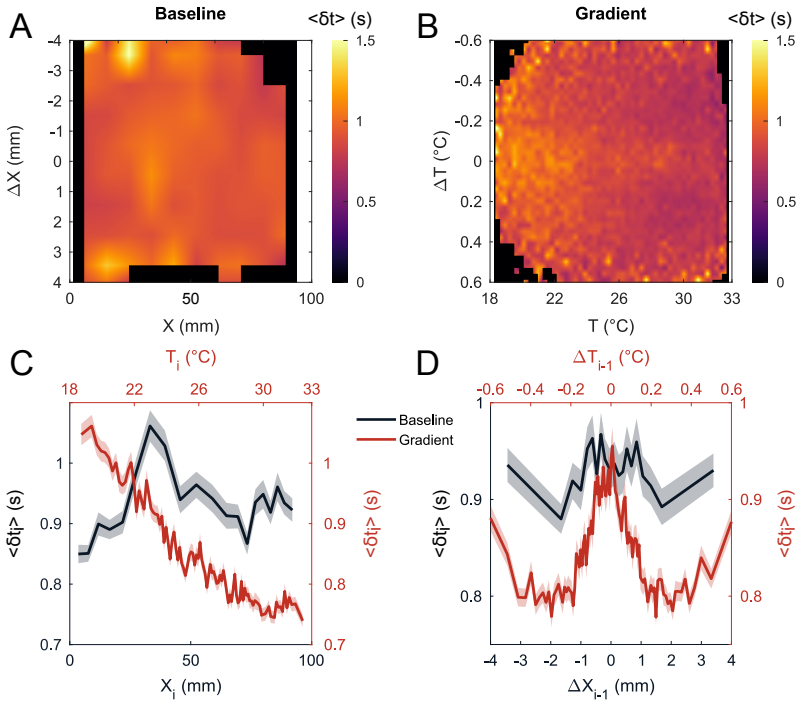


Fig. II.10 *Effet de la température et du gradient sur l'intervalle inter-mouvement.* ***A-B*** *Cartes bi-dimensionnelles montrant la valeur moyenne de l'intervalle inter-mouvement pour chaque paire de* ***A*** *position actuelle X et projection horizontale du déplacement ΔX précédent, et* ***B*** *température actuelle T et changement de température ressenti au mouvement précédent ΔT.* ***C*** *Intervalle inter-mouvement moyen en fonction de la position (noir) et de la température (rouge). Les zones ombragées correspondent à l'erreur standard sur la moyenne dans chaque bin.* ***D*** *Intervalle inter-mouvement moyen en fonction de la projection horizontale du déplacement du mouvement précédent (noir) et du gradient de température ressenti pendant le mouvement précédent (rouge). Les zones ombragées correspondent à l'erreur standard sur la moyenne dans chaque bin.*

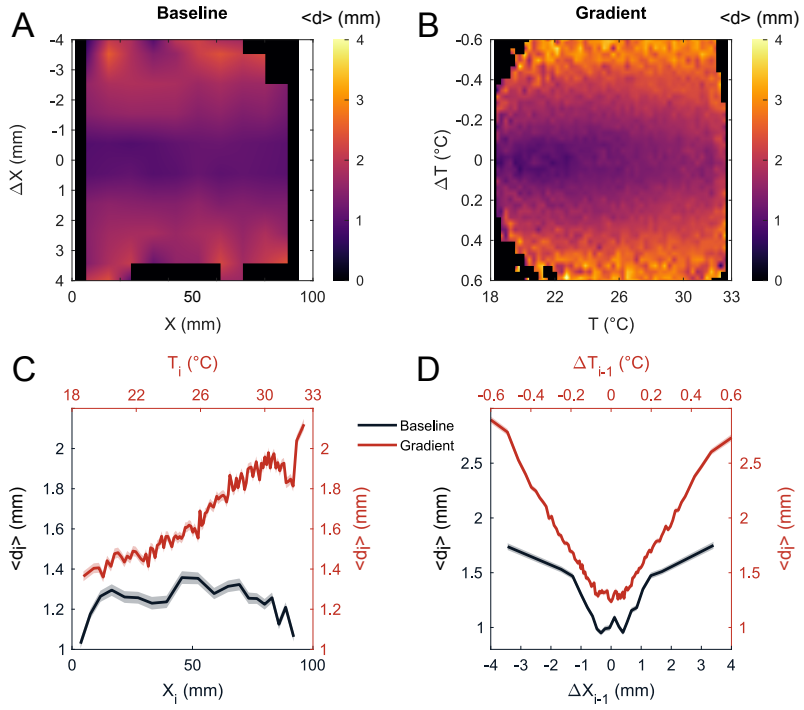


Fig. II.11 *Effet de la température et du gradient sur le déplacement linéaire.* ***A-B*** *Cartes bi-dimensionnelles montrant la valeur moyenne du déplacement pour chaque paire de* ***A*** *position actuelle X et projection horizontale du déplacement ΔX précédent, et* ***B*** *température actuelle T et changement de température ressenti au mouvement précédent ΔT.* ***C*** *Déplacement moyen en fonction de la position (noir) et de la température (rouge). Les zones ombragées correspondent à l'erreur standard sur la moyenne dans chaque bin.* ***D*** *Déplacement moyen en fonction de la projection horizontale du déplacement du mouvement précédent (noir) et du gradient de température ressenti pendant le mouvement précédent (rouge). Les zones ombragées correspondent à l'erreur standard sur la moyenne dans chaque bin.*

ou gauche, du mouvement. La réorientation peut être décomposée en trois composantes : le signe, l'amplitude (valeur absolue), et le type de mouvement, c'est à dire si le poisson va tout droit ou tourne (voir figure I.4B). On s'attend à ce que le signe de la réorientation, à savoir si le poisson va à gauche (positif) ou à droite (négatif) soit symétrique, *i.e.* le poisson n'a pas de préférence pour la droite ou la gauche. On regardera donc seulement l'amplitude, $|\delta\theta|$, qui inclus à la fois l'amplitude et la fraction de mouvement de type tournant. On regardera donc aussi la fraction de tournants parmi tous les événements, p_{turn}, correspondant à la probabilité qu'a la larve de tourner plutôt que d'aller tout droit à chaque mouvement.

Les résultats pour l'amplitude de la réorientation sont montrés en figure II.12 et pour la probabilité de tourner en figure II.13. La figure II.12C montre que l'amplitude augmente d'un facteur deux entre basse température et haute température. Dans une moindre mesure, la probabilité de tourner est également plus grande quand la température est plus haute (figure II.13C).

De manière surprenante, on observe sur la figure II.12D que les réorientations sont de plus grandes amplitude lors de petits déplacement, ce que l'on retrouve sur la probabilité de tourner (figure II.13D). Il est possible qu'il s'agisse d'un effet de binning puisque cet effet n'est pas visible sur les cartes II.12A et II.13A, ou d'un biais du au fait que la cuve est rectangulaire. Un mouvement orthogonal à la direction du gradient ($\Delta T \sim 0$) correspond en effet à la petite dimension de la cuve, biaisant peut-être les réorientations.

Cet effet s'estompe sous l'effet du gradient de température où l'on note une diminution de l'angle lors d'un grand changement de température, mais cette observation ne semble pas tenir en examinant la carte II.12B. En effet, contrairement aux cartes vues précédemment, elle est assymétrique : on observe une inversion de la carte des angles selon le signe du gradient. Pour expliquer cela, on peut faire l'hypothèse que si $\delta\theta$ donne la directionalité à la thermotaxie, alors le signe du gradient de température est à comparer à la température à laquelle se trouve l'animal. En effet, on a vu dans la section précédente que la larve de poisson-zèbre présente une préférence pour des températures comprises entre 22 et 28°C. Ainsi, un gradient positif lorsque le poisson est à une température inférieure à 22°C devrait être bénéfique, de même qu'un gradient négatif lorsque le poisson est au delà de 28°C. Stratégiquement, l'animal devrait traiter le gradient de façon différente selon qu'il est soit d'un côté ou de l'autre de la plage de préférence, ce que semble indiquer l'asymétrie observée sur les cartes de réorientation et de probabilité de tourner. Pour s'en convaincre, on regardera l'effet de la direction du gradient dans le paragraphe suivant.

b).4 Direction du gradient Pour déterminer l'effet du signe du gradient par rapport à l'intervalle de température préférée, on assigne une valeur négative à ΔT quand le

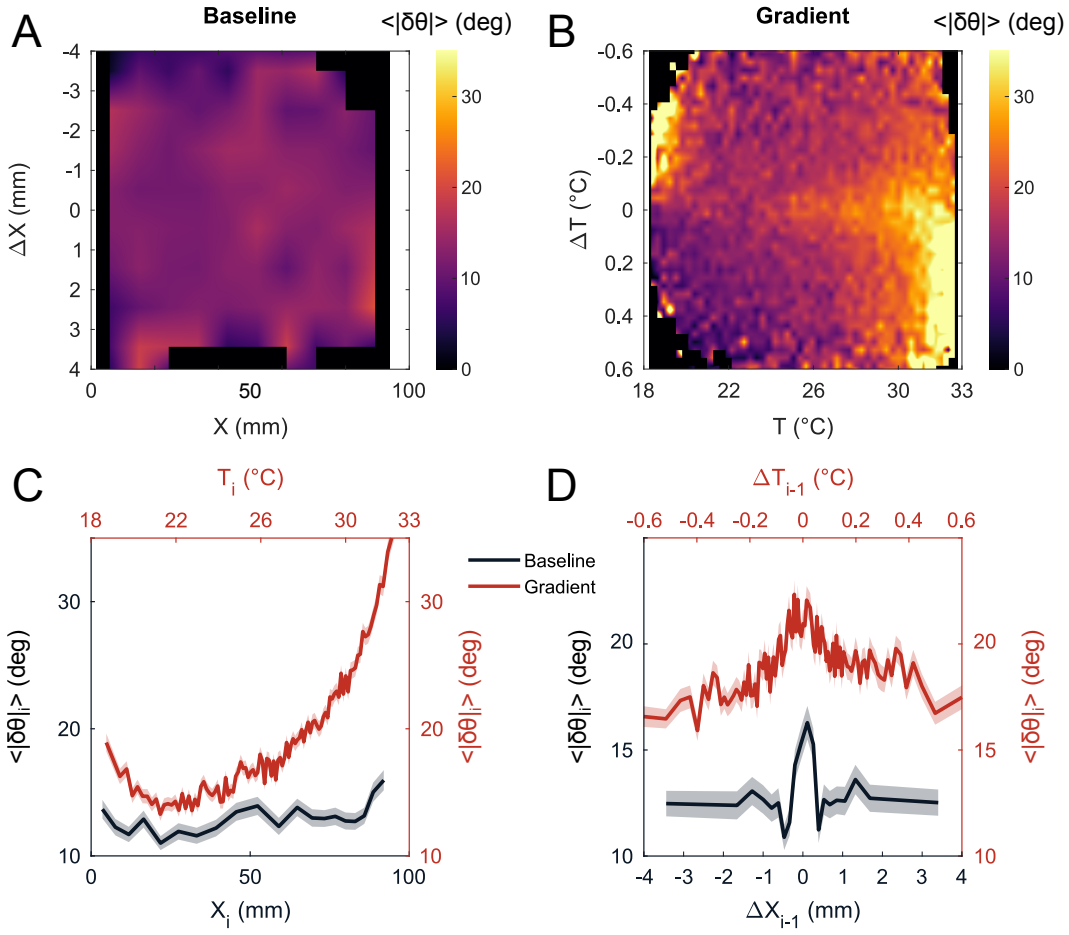


Fig. II.12 *Effet de la température et du gradient sur le déplacement angulaire.* ***A-B*** *Cartes bi-dimensionnelles montrant la valeur moyenne de l'amplitude de la réorientation pour chaque paire de* ***A*** *position actuelle X et projection horizontale du déplacement ΔX précédent, et* ***B*** *température actuelle T et changement de température ressenti au mouvement précédent ΔT.* ***C*** *Amplitude de la réorientation moyenne en fonction de la position (noir) et de la température (rouge). Les zones ombragées correspondent à l'erreur standard sur la moyenne dans chaque bin.* ***D*** *Amplitude de la réorientation moyenne en fonction de la projection horizontale du déplacement du mouvement précédent (noir) et du gradient de température ressenti pendant le mouvement précédent (rouge). Les zones ombragées correspondent à l'erreur standard sur la moyenne dans chaque bin.*

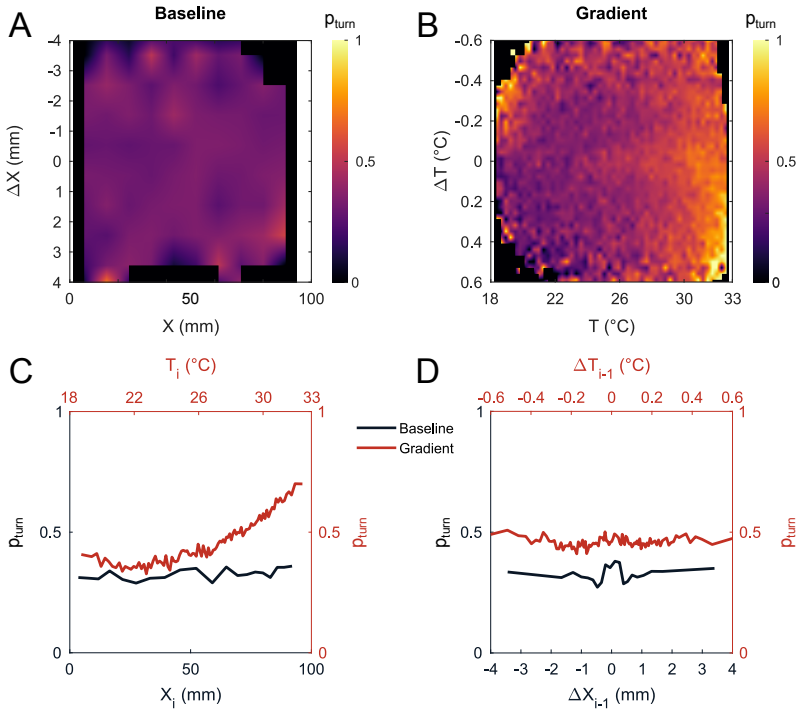


Fig. II.13 *Effet de la température et du gradient sur la fraction de tournants.* ***A-B*** *Cartes bi-dimensionnelles montrant la probabilité de tourner pour chaque paire de* ***A*** *position actuelle X et projection horizontale du déplacement ΔX précédent, et* ***B*** *température actuelle T et changement de température ressenti au mouvement précédent ΔT.* ***C*** *Probabilité de tourner en fonction de la position (noir) et de la température (rouge).* ***D*** *Probabilité de tourner en fonction de la projection horizontale du déplacement du mouvement précédent (noir) et du gradient de température ressenti pendant le mouvement précédent (rouge).*

gradient correspondant s'éloigne de la température optimale, 26°C, tandis qu'une valeur positive est assignée aux ΔT s'en rapprochant. Ainsi, un ΔT positif correspond à un poisson dirigé vers la plage de température préférentielle ; un ΔT négatif correspond à un poisson s'éloignant de ses températures préférées. La même opération est réalisée pendant la condition de base à titre de contrôle. Les courbes résultantes sont montrées en figure II.14.

L'amplitude moyenne de réorientation suite à un mouvement éloignant l'animal de 26°C est à peu près constante ($|\delta\theta| \sim 26°$) et plus élevée que l'amplitude moyenne observée pendant la condition de base. Lorsque la larve se rapproche de 26°C, l'amplitude baisse.

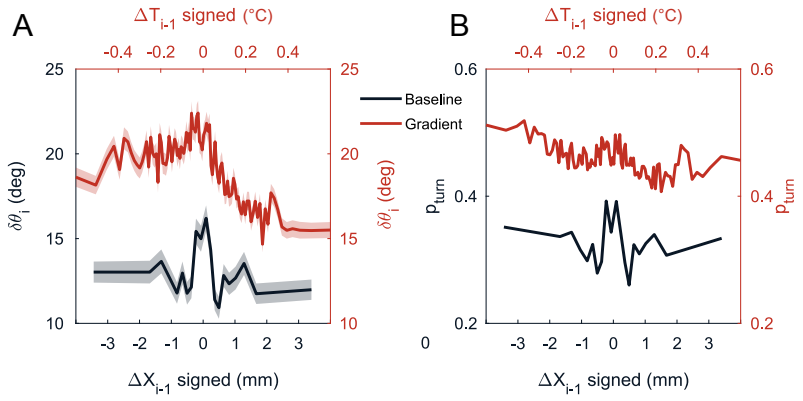


Fig. II.14 *Effet de la direction du gradient par rapport à la plage de température préférée.* ***A-B*** *Moyenne de l'amplitude de la réorientation (**A**) et de la probabilité de tourner (**B**), en fonction du gradient ressenti au mouvement précédent, signé par rapport à la plage de préférence (rouge) et en fonction du déplacement précédent (noir).*

II.1.4 Discussion

La larve de poisson-zèbre montre une préférence pour des température situées entre 22 et 28°C. La température, à la fois sa valeur absolue et sa variation, impacte tous les paramètres cinématiques identifiés.

À haute température, le poisson nage plus souvent, fait des déplacements plus importants, tourne plus souvent et avec des angles de réorientation plus élevés. L'effet de la température absolue pourrait être expliqué de manière purement physiologique : une température basse a tendance à ralentir les processus biologique et pourrait ainsi conduire la larve à être moins active. Inversement, l'augmentation de d avec la température peut être expliqué par le fait que la température augmente le rythme des processus synaptiques [85]. Spécifiquement, un circuit neuronal a été identifié comme crucial pour la durée des battements de queue et donc de la distance parcourue pendant un mouvement [62]. Une augmentation du rythme de ce circuit conduirait alors à une augmentation mécanique du déplacement. Un processus similaire pourrait expliquer l'augmentation de la fréquence de nage et de l'amplitude de la réorientation avec la température. Cette dilatation temporelle par la température est réminiscente du ralentissement des vocalisations de l'oiseau chanteur lorsque son haut centre vocal (HVC) est refroidi [86], suggérant que la température module simplement l'échelle de temps sur laquelle se déroule l'exploration. Notons toutefois qu'il a été montré que certains organismes ectothermes disposent de mécanismes permettant de contrebalancer cette accélération. Chez le crabe (*Cancer*

borealis) par exemple, le rythme du réseau pylorique (contrôlant une partie de l'estomac) augmente avec la température mais le délai d'activation relatif entre les trois types de neurones composant le réseau reste inchangé, assurant une compensation quasi-parfaite de l'effet de la température dans une gamme de 16°C [87, 88, 89]. Nos observations chez la larve de poisson-zèbre ne suggèrent pas l'existence d'un tel phénomène chez cet animal.

Un changement de température induit un temps de repos plus court et une augmentation du déplacement. Ces observations indiquent une intégration de ce dernier pour moduler l'activité motrice de la larve. Si ce changement rapproche le poisson de sa température préférée, l'amplitude de réorientation diminue. Une stratégie similaire a été observée dans le cadre d'une augmentation de l'intensité lumineuse [48], suggérant un processus thermotactique. En effet, si le poisson s'éloigne de sa cible, ses chances de se retourner augmentent, lui permettant de rester confiné dans l'intervalle 22–26°C. Cela est couplé avec une augmentation de l'activité et à une augmentation de la distance parcourue suite à un changement de température, ce qui peut améliorer l'efficacité temporelle du processus.

Finalement, les résultats obtenus par D. N. Robson sont partiellement confirmés et généralisés aux températures inférieures à 25°C. On s'interroge désormais sur les circuits neuronaux impliqués dans le traitement de l'information thermique.

II.2 Réponse neuronale à des jets d'eau

L'idéal, pour identifier les circuits neuronaux impliqués dans les réponses observées en comportement, est de pouvoir répliquer la même expérience sous un microscope permettant l'imagerie calcique afin d'enregistrer l'activité neuronale. Ne disposant pas d'un microscope adapté à l'enregistrement du cerveau d'une larve de poisson-zèbre en nage libre [90, 91], nous ne sommes pas en mesure de copier l'expérience de locomotion dans un gradient thermique. Néanmoins, nous avons développé un système permettant d'étudier la réponse neuronale à des changement contrôlés de température, qui prennent la forme de simples jets d'eau dont la température est pré-définie. La prochaine section détaille le dispositif d'imagerie calcique, le microscope à feuille de lumière ; dans une seconde section, le dispositif permettant la stimulation thermique est décrit.

II.2.1 Dispositif expérimental

a) Microscope à feuille de lumière

Le microscope à nappe de lumière (*lightsheet microscope*) qui a été utilisé pour ce manuscrit a été initialement développé par T. Panier au laboratoire. Si la microscopie de fluorescence a été combinée à la nappe de lumière dès 1993 [92] puis en 2004 dans un échantillon vivant [93], il a été utilisé pour la première fois dans le cadre de l'imagerie calcique en 2008 pour enregistrer une centaine de neurones dans un tissu excisé d'une souris [94]. Au laboratoire, de façon concomitante au groupe de M. Ahrens à Janelia, aux États-Unis, en 2013 [95, 96], cette technique a été utilisée pour enregistrer l'ensemble du cerveau d'un vertébré, la larve de poisson-zèbre.

L'idée à la base de cette technique, aussi appelée SPIM (pour *Selective Plane Illumination Microscopy*), est de découpler l'illumination de l'observation, comme illustré en figure II.15. Contrairement aux techniques de scan point à point (*point scanning microscopy*, PSM) où l'illumination et la détection utilisent le même chemin optique, l'échantillon est ici éclairé par le côté tandis que la fluorescence est récoltée par le haut. Le sectionnement optique résulte ici directement du mode d'illumination.

Le faisceau, issu d'une diode laser à 488nm, est balayé horizontalement par un miroir galvanométrique (dont l'orientation est contrôlée par la tension à ses bornes). Ce dernier est dans le plan focal d'un télescope (deux lentilles qui partagent un même plan focal) qui permet de traduire le déplacement angulaire du miroir en déplacement linéaire du faisceau et ainsi scanner l'échantillon en deux dimensions. La même technique est employée pour balayer le faisceau de haut en bas permettant un scan en trois dimensions de l'échantillon. Le faisceau est collimaté grâce à un objectif 5X de faible ouverture numérique (NA = 0.16),

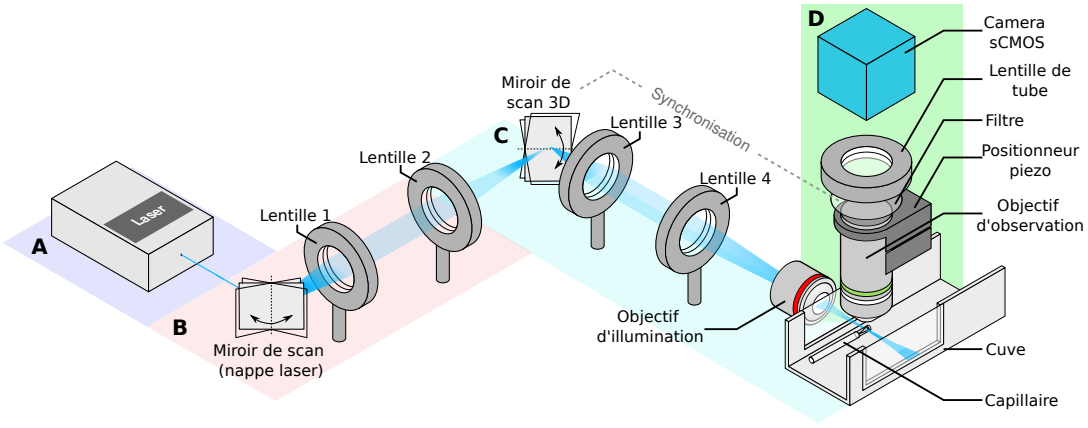


Fig. II.15 *Microscope à nappe laser.* ***A-C*** *Illumination :* ***A*** *Source lumineuse,* ***B*** *Scan horizontal,* ***C*** *Scan vertical.* ***D*** *Observation.*

qui lui donne les bonnes dimensions pour l'échantillon à observer.

Selon l'amplitude de l'oscillation du miroir horizontal, la nappe peut atteindre une largeur de 2mm, amplement suffisante pour balayer l'intégralité de la longueur du cerveau de la larve (typiquement 1mm si on exclut les neurones de la colonne vertébrale). Le point critique est l'épaisseur de la nappe, qui détermine la qualité du sectionnement optique et donc de la résolution verticale. Le faisceau laser étant gaussien, il converge donc vers une épaisseur minimum (le *waist*, noté ω_0) avant de diverger. L'optique gaussienne nous donne la formule théorique de l'épaisseur du faisceau en fonction de la position x le long de l'axe de propagation :

$$\omega(x) = \omega_0 \sqrt{1 + \left(\frac{x\lambda}{\pi\omega_0^2}\right)^2}$$

avec λ la longueur d'onde, 488nm. Ainsi, plus le *waist* ω_0 est petit, plus le faisceau diverge rapidement. Il faut donc trouver un compromis permettant d'avoir une épaisseur de nappe suffisamment petite par rapport à la taille typique d'un neurone (en moyenne $8\mu m$) sur une distance suffisamment grande pour imager toute la largeur du cerveau (400 à $500\mu m$ à 6 jours post-fécondation). L'épaisseur de la nappe le long de l'axe de propagation a été mesurée en étudiant le profil d'émission de billes fluorescentes de 100nm de diamètre lorsque la nappe est déplacée verticalement [95, 97]. Le profil est représenté en figure II.16. On voit ainsi qu'au *waist*, qu'on place sur l'axe rostro-caudal (tête-queue) de l'animal, l'épaisseur est de $4\mu m$, et atteint environ $16\mu m$ à $\pm$ 100 μm du *waist*. 75% des neurones étant situé à une distance inférieure à $100\mu m$ de l'axe central [98], on a donc une résolution proche de la cellule unique sur une large fraction du cerveau.

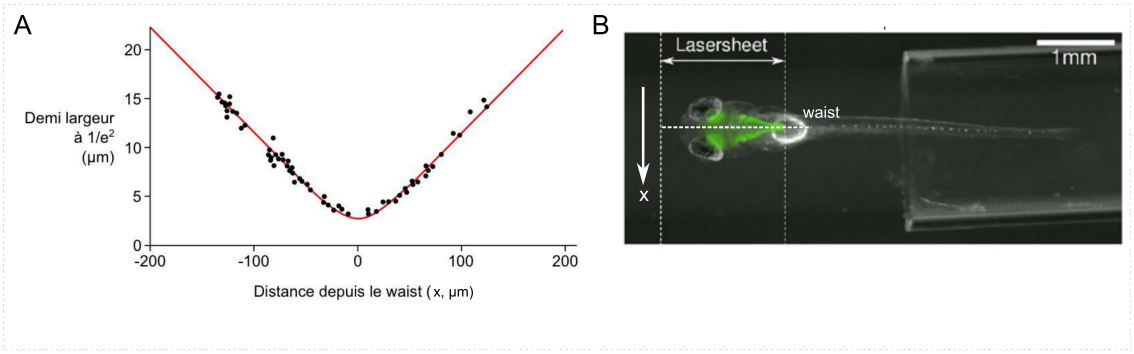


Fig. II.16 *Profil de la nappe de lumière.* ***A*** *Épaisseur de la nappe selon la distance au waist dans la direction de propagation. Les points noirs correspondent aux données, la courbe rouge est l'ajustement par l'équation a).* ***B*** *Superposition d'une image en infrarouge d'une larve de poisson-zèbre immobilisée dans un gel d'agarose (noir et blanc) et d'une image de fluorescence du cerveau de la larve (vert). Adapté de [95].*

Les fluorophores de l'échantillon (en l'occurrence les rapporteurs calciques exprimés dans les neurones, voir section I.2) sont excités et émettent des photons dans des directions aléatoires en revenant à l'équilibre. Ces derniers sont collectés par un objectif 20X à grande ouverture (NA = 1), fixé sur une cale piézoélectrique (dont la position dépend de la tension qui lui est appliqué). Cette cale est synchronisée avec le miroir vertical afin que la nappe soit toujours dans le plan focal de l'objectif. Un filtre *notch* (coupe-bande) permet d'éliminer les photons bleus du laser et de ne collecter que les photons de fluorescence (autour de 510nm, vert). Une lentille de tube ($f = 150mm$) focalise la lumière collectée sur le capteur d'une caméra sCMOS (PCO) afin de produire une image avec une résolution de $0.4\mu m$ par pixel. Cette technique permet alors d'imager une grande partie du cerveau avec une résolution proche de celle du neurone unique, tout en parallélisant l'enregistrement de tous les neurones d'un même plan.

L'ensemble de l'expérience est contrôlé par une interface MATLAB, développée par Raphaël Candelier (disponible sur GitHub GitHub sous licence GPLv3), qui gère les entrées et sorties d'une carte d'acquisition National Instruments. On contrôle ainsi la position des miroirs et de la cale piézoélectrique, l'obturateur du laser, le déclenchement de la caméra et les protocoles de prise d'image au cours du temps. Le logiciel du constructeur de la caméra (PCO) est utilisé pour la prise d'image. Pour imager un volume, on utilise la séquence suivante, dans le mode dit "dents de scie" :

— Commander au miroir vertical et à l'objectif d'aller à une altitude donnée z_0.
— Commencer l'exposition du capteur pendant τ_{exp} (de l'ordre de 10ms).

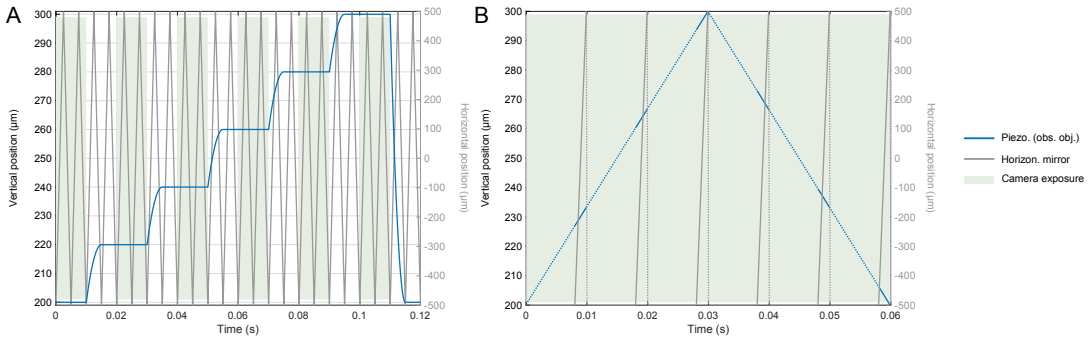


Fig. II.17 *Exemple de commandes pour un cycle d'imagerie, pour 6 couches.* ***A*** *Mode "dents de scie".* ***B*** *Mode "Triangle". Le trait plein bleu indique l'exposition effective (caméra ouverte et laser balayé). Les couches seront entrelacées.*

— Laisser un délai τ_{delay}, le temps d'instruire une nouvelle altitude z_1. Ce temps permet à la cale piézoélectrique de se stabiliser à la nouvelle position.
— Exposer la nouvelle section et recommencer.

Le miroir horizontal balaye le faisceau en permanence à 200Hz et le laser reste allumé à une puissance de 1-2mW.

En répétant ce cycle sur environ 20 sections avec un espace entre chaque couche d'une dizaine de microns, on image séquentiellement tout un volume au cours du temps. Un exemple des commandes envoyées aux miroirs et à la cale piézoélectrique est montré en figure II.17A, avec 6 couches enregistrées pour plus de lisibilité. Dans un scénario réel, on image 20 couches en exposant 10ms chaque couche, et en attendant 10ms entre chaque image. La fréquence d'acquisition des images est de 50Hz (20ms/image), et au total on a donc 2.5 volumes/s. On note que la moitié du temps est perdu à attendre la stabilisation de la cale piézoélectrique. Celle-ci, en effet, bien qu'elle ait une précision nanométrique, nécessite plusieurs millisecondes pour se stabiliser et produire une image nette. Ce délai est décuplé lors de grand changement d'altitude (plusieurs dizaines de microns, voir la fin de la courbe II.17A). Ainsi, dans une telle configuration, la première couche est souvent inexploitable car trop floue.

Afin d'augmenter le nombre de points enregistrés par seconde, ce qui peut se révéler critique lors des procédures de déconvolution (voir section II.2.2), nous avons mis au point une nouvelle stratégie, illustrée à la figure II.17B, dite en "triangle". Il s'agit d'exploiter la précision de la cale piézoélectrique lors d'un mouvement continu. Ainsi, l'objectif balaye le volume sans interruption, de haut en bas, sans grand saut pour revenir au 0. Il faut alors adapter l'exposition et le balayage horizontal pour ne pas imager des couches de travers. En effet, on peut voir l'exposition de la caméra comme une moyenne temporelle sur la

durée d'exposition. Si le cerveau bouge de plusieurs tailles de neurones pendant ce temps, on aura la moyenne de plusieurs couches et l'image sera inexploitable. L'idée est alors de ne balayer qu'une seule fois la couche imagée de manière très rapide et d'éteindre le laser. Ainsi le temps de prise de vue effectif, c'est à dire le temps où le capteur est ouvert et que le laser est allumé et balayé, est minimisé. Pour allumer et éteindre le laser, on utilise un obturateur sous la forme d'un modulateur acousto-optique (AOM). Il s'agit d'un cristal qui diffracte un rayon incident lorsqu'on lui applique une onde acoustique. Un iris permet de ne laisser passer dans le microscope que l'ordre 1, qui n'est présent que lorsque l'AOM est actif. Cela permet d'allumer ou éteindre le laser à très haute fréquence.

L'objectif d'observation est balayé linéairement, de bas en haut (ou de haut en bas), sur l'épaisseur de l'échantillon à imager. Le miroir vertical est cette fois synchronisé sur l'objectif, le miroir galvanométrique étant plusieurs ordres de grandeurs plus rapide que la cale piézoélectrique, on considère que la nappe laser est toujours dans le plan focal de l'objectif. La séquence de prise d'image est la suivante :

— Laser éteint, on commence l'exposition (typiquement 9.9ms) de la caméra. Un délai τ_{before} de 8ms est nécessaire pour que tout le capteur soit ouvert.
— Le laser est allumé, le miroir vertical scanne une fois la longueur de l'échantillon.
— Un délai supplémentaire de 0.1ms est nécessaire pour des raisons électroniques de déclenchement de la caméra (*trigger*). On recommence.

Pour compenser la diminution du temps d'exposition effectif, 1.9ms contre 10ms précédemment, la puissance du laser est augmenté d'un facteur 5. Pour la fluorescence, c'est l'énergie de la lumière qui rentre en jeu, ainsi, 2mW pendant 10ms est équivalent à 10mW pendant 2ms. Notons que pendant l'exposition effective, on a en effet un mouvement vertical d'environ 4 microns (l'ordre de grandeur de l'épaisseur de la nappe). On image donc des tranches légèrement de travers, mais cela n'a pas d'incidence sur l'analyse. Finalement, on image avec cette stratégie à 100Hz (10 ms par image) ; dans les conditions présentées ci-dessus, cela conduit à 5 volumes/s, soit un gain d'un facteur deux par rapport à l'autre stratégie.

La larve de poisson-zèbre, âgée de 5 à 7 dpf, est placée dans un gel d'agarose à 2%. Ce gel, solide en dessous de 37°C, permet de maintenir immobile la larve tout en permettant son oxygénation (principalement par diffusion à travers la peau à cet âge là). Si besoin, on peut y ajouter un agent paralysant, le pancuronium bromide (à 0.3mg/mL) pour limiter les mouvements ponctuels qui peuvent gêner l'analyse. Le spécimen, plongé dans le gel d'agarose encore liquide est pompé dans un capillaire en verre à l'aide d'un piston. Lorsque le gel est solidifié, on pousse l'animal de sorte à ce que le cerveau soit en dehors du verre. Le gel étant composé à 98% d'eau, son indice optique lui est similaire et on limite ainsi les aberrations optiques.

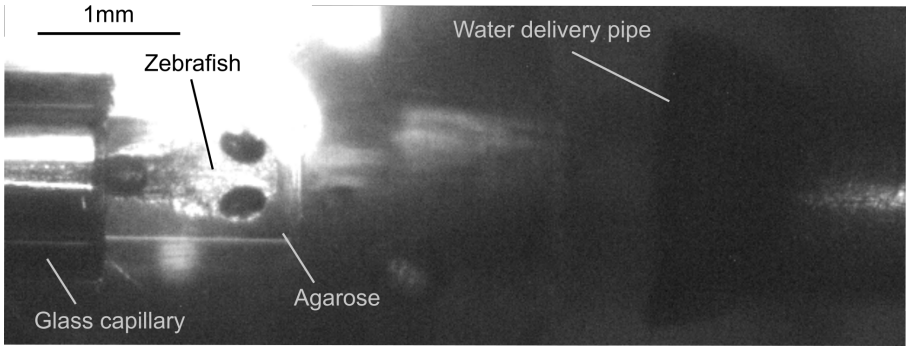


Fig. II.18 *Photo de la larve de poisson-zèbre face au tuyau lui délivrant les stimulations thermiques. Prise du dessous de la cuve, on voit en arrière-plan l'objectif d'observation. La nappe laser arrive par le haut. Lors de la calibration, l'animal est remplacé par un thermocouple.*

Le capillaire est alors placé dans un porte-échantillon fait sur mesure, lui-même supporté par une platine micrométrique trois dimensions, qui permet de positionner l'animal par rapport à la nappe laser et à l'objectif. Comme on peut le voir dans la figure II.19A, le capillaire est immergé dans un bassin ouvert sur le dessus (pour laisser passer l'objectif d'observation) et présentant des fenêtres en verre sur les côtés pour permettre au faisceau laser de passer. Le fond de cette cuve est en étain pour optimiser le transfert de chaleur (voir section suivante), et doté d'une fenêtre pour avoir la possibilité de filmer la larve par le dessous. La figure II.18 est une photo prise par cette fenêtre, montrant le poisson dans le cylindre d'agarose tenu par le capillaire en verre sous l'objectif d'observation.

b) Module de stimulation thermique

On cherche à présenter au poisson des variations de température. Pour cela, des jets d'eau à température contrôlée lui seront imposés. Le poisson étant protégé par l'agarose, il ne devrait n'y avoir aucune réponse au courant [99], mais la température devrait rapidement diffuser dans l'ensemble du cylindre d'agarose.

La climatisation de nos locaux n'étant pas un modèle de fiabilité, on a dans un premier temps répliqué le système de régulation en température décrit en détail dans la section II.1.2 : un module de Peltier attaché au bas du bassin en étain, dont la puissance est asservie à la température lue par un thermocouple placé le plus près possible du poisson sans gêner l'imagerie (figure II.19A). Le fonctionnement de la boucle de rétroaction pour maintenir le bassin (ou du moins la région environnante du poisson) à une température de commande est identique à celle détaillée plus tôt (voir section II.1.2). Dans la suite, on utilisera ce module pour stabiliser la température à 22°C, celle de la pièce, qui est la

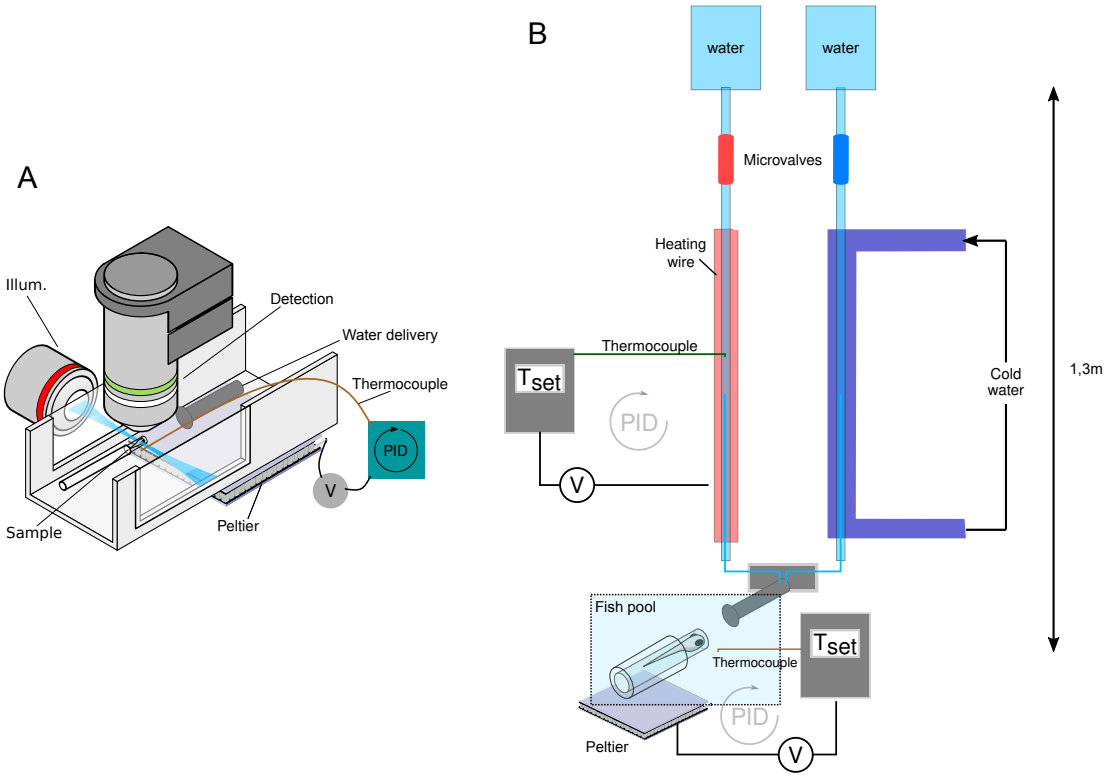


Fig. II.19 *Système de stimulation thermique sous nappe laser.* ***A*** *Régulation et stimulation thermique lightsheet-compatible. Le tuyau délivrant l'eau chaude ou froide au poisson est connecté au reste du système représenté dans* ***B****.* ***B*** *Système de stimulation thermique. Le tuyau final fait face au poisson et est alimenté par de l'eau chaude ou froide. Le schéma n'est pas à l'échelle.*

température standard à laquelle ont été réalisées la plupart des expériences d'imagerie calcique chez la larve de poisson-zèbre.

Vient ensuite le système de stimulation thermique à proprement parler, illustré en figure II.19B. Celui-ci consiste en deux tuyaux reliant deux réservoirs d'eau de 50mL à un petit tuyau métallique d'environ 1,5mm de diamètre évasé au bout qui fait face au poisson. Le flux dans chacun des tuyaux, simplement dû à la différence de hauteur (1,30m environ) entre les réservoirs et le tuyau final, est contrôlé par deux microvalves électromécaniques. Deux sorties numériques de la carte d'acquisition mentionnée dans la section a) permettent de contrôler l'ouverture des deux valves qui permet de produire un jet.

L'un des deux tuyaux (en rouge dans la figure II.19B), qui permet de produire un jet chaud, est en contact sur environ 50cm avec un fil chauffant, et ce à 10cm de la sortie

d'eau, devant le poisson. Les deux éléments (tuyau et fil chauffant) sont solidarisés avec une gaine thermorétractable. Un thermocouple est inséré au milieu de la partie chauffée du tuyau et permet de contrôler la puissance de chauffe du fil chauffant grâce à une PID implémentée dans un contrôleur commercial (Omega Engineering). Ainsi, la température de l'eau délivrée au poisson est contrôlée. Bien entendu, les déperditions de chaleur entre le segment chauffé et le poisson sont significatives et une étape de calibration sera nécessaire (voir ci-après). Le deuxième tuyau (en bleu dans la figure II.19B), dit froid, passe quant à lui dans le tuyau de recirculation d'un bain réfrigéré (Huber Ministat), qui fait circuler un liquide à température donnée (de 20 à 0°C). L'eau passant dans le tuyau froid est ainsi refroidie avant d'être envoyée sur le poisson. Là encore, une étape de calibration sera incontournable.

Pour mesurer précisément le signal thermique perçu par le poisson en fonction de la durée des impulsions d'eau et la température de commande des différents circuits, la larve de poisson-zèbre est remplacée par un thermocouple. Le même protocole de montage est appliqué : la sonde est mise dans un capillaire rempli d'agarose. Lorsque ce dernier est solide, elle est sortie du verre dans son cylindre et placée là où serait le poisson (voir figure II.18). Le protocole de stimulation est alors lancé et la température enregistrée. Plutôt que de construire une table de conversion température de commande – température ressentie par le poisson, nous avons fait le choix de faire une calibration systématique avant chaque expérience. Ainsi, avant l'enregistrement de l'activité neuronale pendant une stimulation thermique, on enregistre la température pendant ce même protocole.

Ce protocole, dont un exemple est illustré dans la figure II.20A, consiste en 20 jets d'eau à température donnée. L'intervalle de temps entre chaque début de stimulation (*onset*) est tiré aléatoirement, aux conditions que chaque stimulation soit séparée d'au moins 10 secondes d'une autre (pour laisser le temps à la température de revenir proche de la ligne de base) et au plus 30 secondes (pour limiter la durée de l'expérience). La période de stimulation dure ainsi au maximum environ 500s, et on laisse 300s (5 minutes) supplémentaires à la fin de l'expérience pour établir une ligne de base de l'activité neuronale. Plusieurs températures de commande, et donc plusieurs amplitudes de température, auront l'occasion d'être testées.

La calibration permet de s'assurer que les jets d'eau arrivent bien au poisson/thermocouple et que la température diffuse bien dans le gel d'agarose. De plus, on peut caractériser la stabilité et la dynamique de la stimulation. Pour cela, on peut regarder la moyenne temporelle post-stimulus. Cela consiste à moyenner la température par fenêtre de temps de 10s après chaque début de stimulation. Deux "stimulations moyennes" issues de la figure II.20A sont montrées en figure II.20B. Dans ce graphique, le 0 en temps correspond au déclenchement de la commande d'ouverture de la microvalve. L'eau à température doit alors

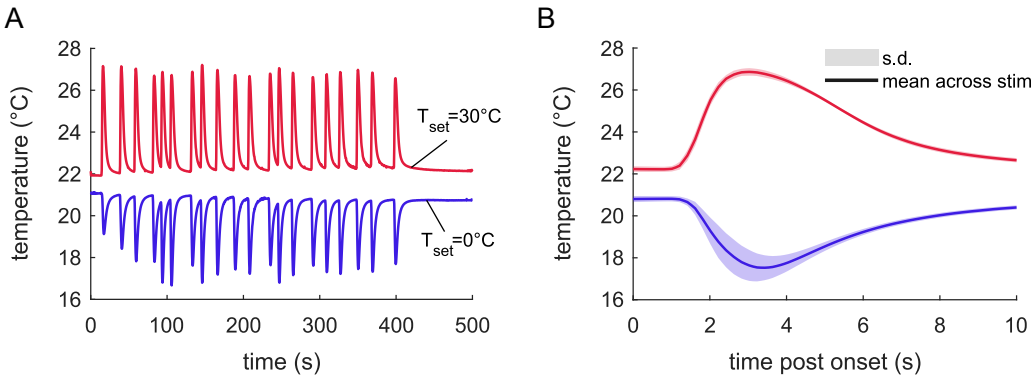


Fig. II.20 *Stimulation thermique.* ***A*** *Deux exemples de protocole, chaud (rouge, environ +5°C) et froid (bleu, environ -3°C). 20 stimulations aléatoirement espacées dans le temps.* ***B*** *Moyenne temporelle post-stimulus. Trait plein : moyenne, aire ombrée : écart-type.*

couler jusqu'au tuyau final, être libérée dans le bassin et atteindre le boudin d'agorose ; la température doit alors diffuser jusqu'au poisson/thermocouple. Ce processus prend un peu moins de 2s. Le pic de chaleur est atteint au bout de 3s, puis on a une lente décroissance vers la ligne de base qui dure 7s supplémentaires. La variabilité d'une stimulation à l'autre est quantifiée par l'écart-type, représentée sous la forme d'ombre entourant la courbe dans la figure II.20B. Cette dernière est minimale pour les stimulations chaudes (moins de 0.3°C) et plus grande pour les stimulations froides (moins de 1°C).

II.2.2 Méthodes d'analyse

Cette section a pour objectif de détailler les routines d'analyse de base des données issues du microscope, indépendamment de la température. Un jeu de donnée typique issu de l'expérience d'imagerie calcique consiste en une série de plusieurs dizaines de milliers d'images, de taille de l'ordre de 1600×800 pixels, codées sur 16 bits, conduisant à des films de l'ordre de la centaine de Go. En imageant n couches à la fréquence f_{aq} pendant un temps total T, la série de $N = f_{aq} \times T$ images est composée de N/n cycles de n images, un cycle correspondant à un volume, imagé à f_{aq}/n Hz. Le but des routines décrites ci-dessous est d'extraire de cette grande quantité de données les informations utiles, pour finir avec des signaux calciques temporels pour toutes les cellules imagées sur chaque couche sur lesquels on pourra travailler.

Pour ce faire, on utilise un *pipeline* de scripts MATLAB initialement développé par

G. Debrégeas, R. Candelier et R. Olive, et modifié en profondeur par mes soins pour répondre au mieux à mes besoins.

a) Pré-traitement des données

La première étape est d'identifier les corps cellulaires correspondant aux neurones. Pour cela, quelques étapes de traitement d'image sont nécessaires afin de détecter automatiquement les objets. Ces étapes, réalisées séquentiellement pour chaque couche, sont illustrées dans la figure II.21.

Après avoir défini le masque qui inclut seulement le cerveau (ligne rouge dans A), la moyenne temporelle est calculée sur environ 10% du total d'images correspondantes à cette couche. Cela permet de réduire le bruit. Ensuite, un filtre gaussien est appliqué pour réduire encore le bruit, et un étirement du contraste local permet de mieux séparer les corps cellulaires du noyau, le corps étant blanc (noir) et le noyau noir (blanc) pour les lignées cytoplasmiques (nucléaires, respectivement). Enfin, un algorithme de détermination de la ligne de partage des eaux (*watershed*) est appliqué. Ce dernier traite l'intensité de chaque pixel comme une altitude, et discrimine ainsi les vallées (noyau) des sommets (cytoplasme). Dans le cas des lignées exprimant le rapporteur calcique dans le noyau, ces derniers sont blancs tandis que le cytoplasme apparaît en noir : l'image est alors inversée pour l'algorithme *watershed*. Les neuropiles, qui ne contiennent que très peu de corps neuronaux, sont néanmoins inclus dans l'analyse des lignées cytoplasmiques.

Les objets identifiés de cette façon sont ensuite filtrés sur un critère de taille, d'excentricité et de corrélation avec les pixels voisins (*average neighborhood correlation*). Enfin, un filtrage manuel peut être réalisé pour inclure (rejeter) des objets qui auraient été rejetés (validés, respectivement) en tant que neurones. On réalise ensuite les mêmes opérations pour la couche suivante. Ce bloc d'instruction est le seul dirigé activement par l'utilisateur et dure 10 à 20 minutes pour une expérience avec 20 couches sur 15-30 minutes. L'extraction des signaux de chaque neurones, détaillée dans la section suivante, dure quant à elle plusieurs heures – mais ne requiert pas d'intervention manuelle.

b) Extraction des signaux

Connaissant la position des neurones présents dans chaque couche, le programme va ensuite extraire les signaux de chaque image. Pour ce faire, chaque image est lue l'une après l'autre. La première chose à faire est de corriger l'éventuelle dérive (*drift*) de l'animal au cours du temps. On utilise pour cela la corrélation de l'image analysée avec l'image moyenne, qui calcule le vecteur déplacement (dx, dy) de l'image par rapport à l'image moyenne (notons que pour calculer cette image moyenne, la correction de la dérive est

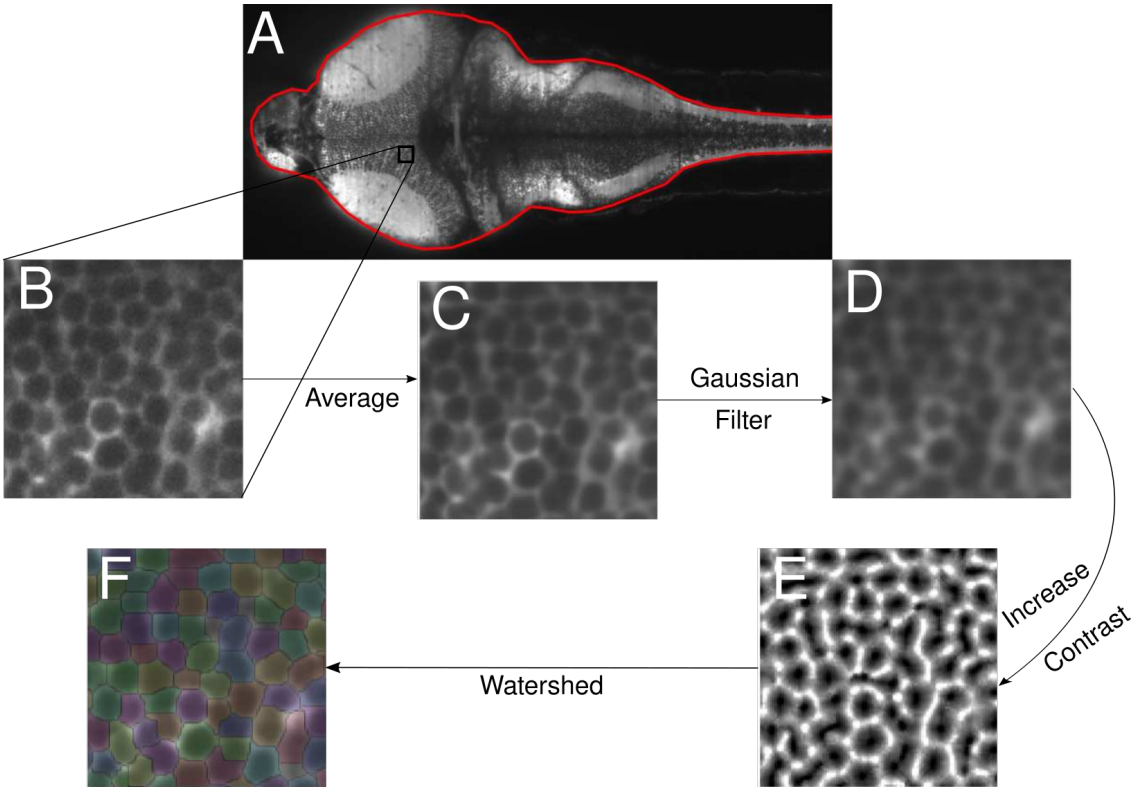


Fig. II.21 *Segmentation d'une image en neurones, sur une couche de cerveau exprimant le rapporteur calcique dans le cytoplasme.* ***A*** *Délimitation du contour du cerveau (masque rouge).* ***B*** *Zoom sur une partie de l'image pour illustration.* ***C*** *Moyenne temporelle : réduction du bruit.* ***D*** *Filtre gaussien : convolution avec un kernel gaussian circulaire pour réduire le bruit et les artefacts dus aux mouvements.* ***E*** *Augmentation du contraste local dans un carré de la taille typique d'un neurone pour les séparer au mieux du fond.* ***F*** *Algorithme watershed qui identifie les objets. Adapté de [98].*

faite avec la même méthode, en corrélant l'image courante avec la première).

La fluorescence, c'est à dire l'intensité de l'image, est collectée pour tous les pixels qui composent un neurone et est moyennée, ce qui débruite grandement le signal (un neurone est représenté par une centaine de pixels). La fluorescence par neurone et le déplacement de l'image sont sauvegardés. La fluorescence, qui est une valeur arbitraire dépendant de l'intensité du laser, du taux d'expression du rapporteur calcique et de la sensibilité de la caméra, n'est pas une quantité facilement comparable d'un poisson à l'autre, d'un laboratoire à un autre. Dépendant de l'intensité du laser, elle peut reproduire les éventuelles fluctuation d'intensité de ce dernier. Dépendant aussi du niveau de fluorescence du poisson, elle peut contenir une longue baisse (sur une échelle de plusieurs dizaines de minutes) correspondant à du photoblanchiement. C'est pourquoi une quantité standard en imagerie calcique, le $\Delta F/F$, a été introduite. Elle représente la variation relative d'intensité de fluorescence par rapport à une ligne de base (*baseline*) dépendant de chaque neurones ou pixels qui correspond à la fluorescence en l'absence d'activité. Elle est définie de la façon suivante :

$$\frac{\Delta F}{F}(t) = \frac{F(t) - F_{baseline}(t)}{F_{baseline}(t) - F_{background}}$$

avec $F(t)$ la fluorescence mesurée, $F_{baseline}(t)$ la fluorescence de base et $F_{background}$ la fluorescence du fond, correspondant à l'absence totale de fluorescence (le capteur de la caméra enregistrant un certain nombre de coup à blanc, correspondant à sa sensibilité minimale, cette valeur n'est pas nulle). À titre d'exemple, la trace de fluorescence (noir) et la ligne de base (rouge) d'un neurone sont montrées en figure II.22A ; le $\Delta F/F$ résultant (bleu) est montré en figure II.22B.

La ligne de base est déterminée en lui attribuant (de manière empirique), pour chaque pas de temps de chaque neurone ou pixel, la valeur du 18^e centile d'une fenêtre temporelle glissante de 50s. Cette valeur a été choisie afin de neutraliser les longues dérives de fluorescence qui ont très peu de chance de correspondre à de l'activité, cette dernière n'étant que très rarement (jamais ?) maintenue pendant aussi longtemps. Cette courbe est ensuite lissée par une moyenne glissante avec une fenêtre de 60s, pour éviter les décrochages brusques de la ligne de base qui pourraient artificiellement donner lieu à une fluctuation du $\Delta F/F$ sans lien avec le signal calcique.

Pour chaque neurone d'une couche, la ligne de base puis le $\Delta F/F$ sont calculés et enregistrés. Le programme passe alors à la couche suivante et réitère les opérations susmentionnées. Lorsque toutes les couches ont été traitées, l'utilisateur dispose de toutes les informations nécessaire pour aller plus loin : la dérive de l'image, la position et les pixels composant les neurones segmentés, leur fluorescence, leur ligne de base et leur $\Delta F/F$, au cours du temps.

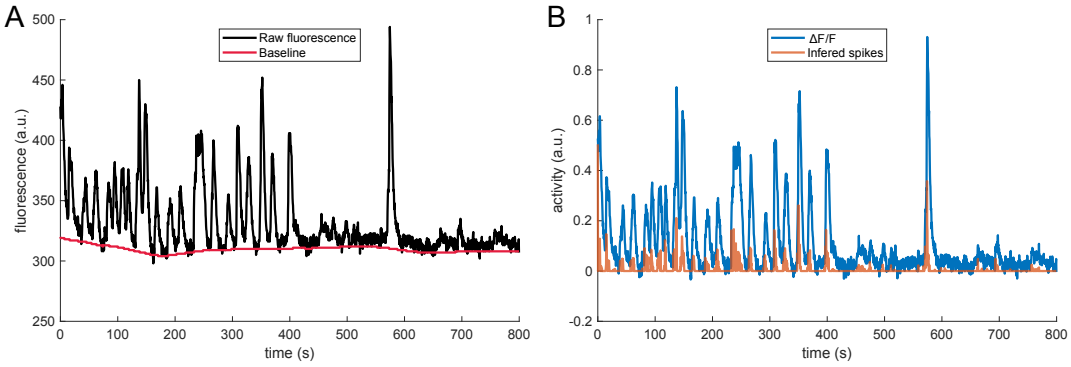


Fig. II.22 *Extraction des signaux d'un neurone.* ***A*** *Fluorescence brute extraite des images (noir) et ligne de base (rouge).* ***B*** $\Delta F/F$ *résultant calculé avec l'équation b) (bleu) et résultat de la déconvolution et inférence de potentiels d'action (orange).*

Un certain nombre d'opérations supplémentaires peuvent être alors réalisées, selon les besoins. Par exemple, on peut avoir besoin de la fluorescence et du $\Delta F/F$ de chaque pixel, plutôt que par neurone, pour reconstruire des images, par exemple. La technique employée est la même mais est beaucoup plus computationnellement lourde, chaque couche comportant une centaine de milliers de pixels, contre 1000 à 5000 neurones.

Enfin, il existe des algorithmes de débruitage et d'inférence de potentiels d'action (*spikes*) [100, 101, 102, 9]. En effet, il faut se rappeler que la fluorescence n'est qu'un *proxy* de l'activité neuronale réelle (voir section I.2). Un algorithme, *blind sparse deconvolution* (BSD), a été développé en collaboration avec le laboratoire [9]. Le principe est de déconvoluer la trace de $\Delta F/F$, cette dernière étant théoriquement le résultat d'impulsions très courtes (les potentiels d'action, moins d'une centaine de milliseconde) convoluées avec le noyau calcique (le produit d'une exponentielle croissante et d'une exponentielle décroissante, voir équation I.2). L'algorithme permet d'estimer quel train de potentiels d'action a le plus de chance d'expliquer la fluorescence observée. L'algorithme calcule également un seuil qui permet de ne garder que les estimations les plus robustes, c'est à dire les bouffées de fluorescence dont on est sûr qu'elles ont été causées par une réelle activité du neurone. Un exemple de *spikes* inférés avec cette méthode est montré en figure II.22B, orange.

c) Alignement du cerveau sur un atlas morphologique

La moyenne temporelle, qui consiste en une pile d'image représentant au mieux le cerveau que l'on a imagé, permet de localiser les neurones dans l'espace. Plusieurs équipes de par le monde se sont attelées à créer de véritables atlas du cerveau de la larve de poisson-zèbre, répertoriant toutes les régions identifiées [30, 103, 104, 105]. Pour comparer les cerveaux issus de notre laboratoire à ces différents atlas, il faut les transformer pour qu'ils soient représentés dans le même espace. Pour cela, une technique de recalage d'image (*image registration*) est employée. On utilise le logiciel CMTK qui a notamment été utilisé pour créer l'atlas ZBrain [30]. Celui-ci calcule les transformations, linéaires ou non, qui permettent d'aligner le cerveau issus de notre laboratoire sur un des cerveaux de référence fournis par les atlas. On peut alors, en transformant les coordonnées (x, y, z) des centres de masse des neurones exprimées dans "l'espace LJP" en coordonnées de "l'espace ZBrain", connaître à quelle région (au nombre de 294 dans ZBrain) appartient chaque neurones.

Au sein-même du laboratoire, on dispose d'un cerveau de référence, utilisé par tous ses membres. On peut ainsi convertir les cerveaux de différents poissons sur un unique patron, ce qui facilite les comparaisons individu à individu ou encore calculer des moyennes inter-individuelles.

d) Conditionnement et export

Toutes ces opérations génèrent un certains nombres de fichiers, séparés par type (images moyennes, segmentation, fluorescence, ligne de base, $\Delta F/F$, ...) et par couche (couche 1, couche 2, ...). En restant sur le même poste de travail, cela ne pose pas de problème, car nous disposons d'outils qui permettent facilement d'aller chercher tel ou tel jeu de données.

En revanche, pour transférer l'ensemble des données d'un poste à un autre, d'une personne à une autre ou d'un laboratoire à un autre, cela peut vite devenir limitant. C'est pourquoi, avec un autre doctorant du laboratoire, H. Trentesaux, et un stagiaire, T. van der Plas, nous nous sommes mis d'accord sur un format de fichier, le HDF5 (*Hierarchical Data Format*), déjà utilisé par d'autres groupes. Ce format, standard et lu par nombre de langages de programmation, présente une structure hiérarchique idéale pour enregistrer divers *datasets* sous des noms transparents, auxquels on peut rattacher des attributs donnant des détails (unités, format, ...). Ainsi, un unique fichier de moins de 5 Go regroupe l'ensemble des données (par neurones) dans un format versatile et simple à partager. J'ai également développé un paquet MATLAB permettant de simplifier la manipulation et la visualisation des données à partir du seul fichier HDF5. Un exemple d'outil de visualisation est montré en figure II.23.

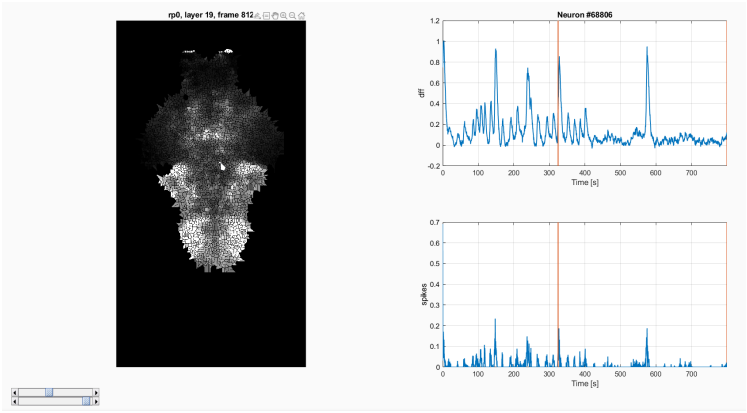


Fig. II.23 *Outil de visualisation à partir d'un seul fichier. À gauche, le $\Delta F/F$ sous forme d'image segmentée. L'utilisateur peut cliquer sur un neurone pour voir la trace de son $\Delta F/F$ (en haut à droite) et le résultat de l'inférence des potentiels d'action (en bas à droite). Deux curseurs (en bas à gauche) permettent de se déplacer en temps et en altitude.*

II.2.3 Résultats préliminaires : cartes de réponse

On dispose finalement de 30 jeux de données correspondant chacun à une expérience, concernant 18 poissons différents, contenant les traces d'activité de 68348 ± 20870 neurones (moyenne ± écart-type) par expérience. Chaque poisson a été soumis à une ou plusieurs itérations du protocole décrit à la section b), avec des températures de commande différentes. 17 stimulations sont à variation positive ("chaud"), de 3 à 7°C, correspondant à des températures maximales ressenties (la valeur des pics de la figure II.20B) de 24 à 30°C, sur 13 poissons. 11 autres expériences correspondent à des stimulations "froides", avec des variations de -1°C à -5°C, pour des valeurs aux pics de 21 à 11°C, sur 11 poissons.

En regroupant les données à gradient positif d'une part et celles à gradient négatif d'autre part puis en séparant la partie de l'enregistrement correspondant à l'activité spontanée (les 5 dernières minutes) de la partie sous stimulation (les 8 premières minutes lors desquelles le poisson reçoit 20 impulsions d'eau chaude ou froide), on peut tracer les distributions de l'activité ($\Delta F/F$) pour chacune des époques, pour le chaud et le froid, comme affiché dans la figure II.24. Les parties qui se superposent autour de 0 correspondent à du bruit qui est bien ajusté par une fonction Gaussienne (tirets noirs). L'asymétrie observée à $\Delta F/F > 0$ correspond à de l'activité neuronale, qui est bien présente pendant la partie spontanée (courbe noire). Pendant les périodes de stimulations, les $\Delta F/F$ élevés sont plus fréquents que pendant la partie spontanée, indiquant que l'activité globale est plus forte pendant la stimulation, suggérant effectivement une réaction du poisson aux variations

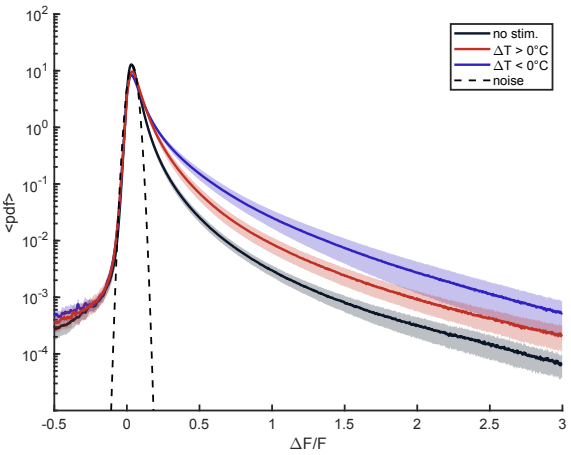


Fig. II.24 *Distributions moyennes des $\Delta F/F$ pendant la période sans stimulation (noir), pendant une période de stimulation à gradient positif (rouge) et négatif (bleu). La distribution noire pointillée est une estimation du bruit gaussien.*

de température.

Pour contrôler si l'efficacité du rapporteur calcique est dépendant de la température, on utilise les données d'activité spontanée enregistrées sur le même poisson à 4 ou 5 températures différentes, et on en extrait la moyenne de l'intensité de la fluorescence sur 1000 images prises sur une couche donnée, pour les 5 jeux de données. Puisqu'il existe un photoblanchiement d'une expérience à l'autre, on réitère cette procédure sur 3 poissons différents, où les températures ont été choisies dans un autre ordre. Le résultat est présenté sous forme de boîte à moustache dans la figure II.25A. Les poissons 1 et 3 montrent un photoblanchiement d'une expérience à l'autre tandis que le poisson 2 non, mais ce dernier présente un niveau de fluorescence moindre. Dans tous les cas, il ne semble pas y avoir une dépendance robuste du niveau de fluorescence avec la température. Pour s'en convaincre, la moyenne de chaque boîte est tracée en fonction de la température dans la figure II.25B. Le coefficient de corrélation de Pearson est de 0.078, contre-indiquant une relation entre intensité de fluorescence et température. Enfin, des expériences avec des jets d'eau ont été menées sur des poissons n'exprimant pas le rapporteur calcique mais seulement la GFP et les mêmes analyses ont été réalisées : les distributions des $\Delta F/F$ sont similaires à du bruit Gaussien et aucun effet n'est observé après une stimulation (non montré pour cause de *crash* des disques durs hébergeant ces données).

La première analyse consiste à caractériser la réponse globale du poisson, à l'échelle du cerveau entier, aux variations de températures. La configuration de notre microscope ne nous permet pas d'imager les couches très ventrales de l'animal, notamment, on ne

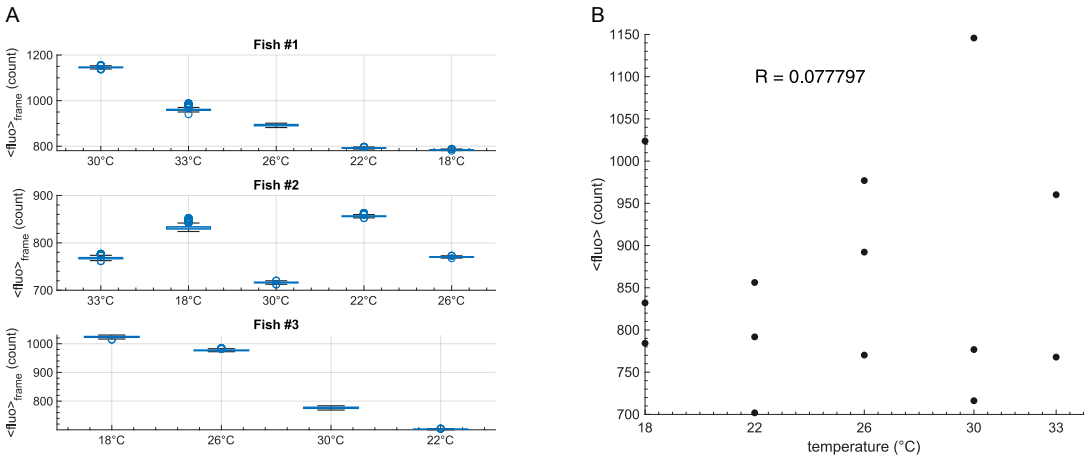


Fig. II.25 *Effet de la température sur la fluorescence.* ***A*** *Fluorescence moyenne sur 1000 images en fonction de la température. Les températures sont ordonnées dans l'ordre dans lequel les expériences ont été réalisées.* ***B*** *Moyenne des boîtes montrées dans* ***A*** *en fonction de la température. Le coefficient de corrélation de Pearson* $R = 0.08$ *ne montre pas de relation entre température et intensité de la fluorescence.*

peut pas enregistrer l'activité des ganglions trigéminaux. De manière générale, on ne s'intéressera pas à la hiérarchie temporelle de l'activité, c'est à dire qu'on ne cherchera pas à savoir si les neurones répondent directement à la chaleur (comme c'est le cas des ganglions trigéminaux) ou s'ils sont activés par neuromodulation. On se contentera ici de déterminer quels sont les neurones impliqués dans la chaîne de la perception de la chaleur.

Pour cela, une méthode standard est la régression multilinéaire [106]. Il s'agit de supposer que les signaux des neurones sont issus d'une combinaison linéaire de plusieurs régresseurs (ou variables prédictrices) G. En notation matricielle, si l'on a n pas de temps et m neurones, on construit la matrice X représentant l'activité des neurones, de dimension $n \times m$, et on écrit :

$$X = G\beta + \epsilon$$

avec β les coefficients de régression et ϵ les résidus.

La construction des régresseurs à partir de la trace de la stimulation enregistrée pendant la calibration est schématisée dans la figure II.26. On choisit trois régresseurs : (i) la trace de stimulation, (ii) la partie positive de la dérivée et (iii) la valeur absolue de la partie négative de la dérivée, pour identifier les neurones accordés à une augmentation ou à une diminution de la température, respectivement. Comme on cherche les neurones s'activant sous l'effet de la stimulation, pour que les signaux de ces derniers soient accordés

avec ce régresseur, la trace correspondant à un gradient négatif est inversée :

$$S^{\star}_{cold}(t) = \max(S(t)) + \min(S(t)) - S(t)$$

Chaque régresseur est convolué avec un noyau calcique (la fonction double-exponentielle, voir équation I.2). Les constantes de temps de croissance et décroissance (τ_{rise} et τ_{decay}) du noyau calcique ont été inférées par BSD [9], en utilisant l'activité spontanée de 3 poissons enregistrés à 10Hz (environ 5000 neurones par poisson). Cela a donné pour les lignées *slow* : $\tau_{rise} = 0.2s$ et $\tau_{decay} = 3.55s$. Pour les lignées *fast* : $\tau_{rise} = 0.15s$ et $\tau_{decay} = 1.6s$. Enfin, l'ensemble des régresseurs sont rendus orthogonaux grâce à l'algorithme Gram-Schmidt [106], ce qui les rend indépendants.

Le but de la régression est alors de trouver les coefficients β qui minimisent l'erreur entre le signal enregistré (le $\Delta F/F$) et le modèle de la forme donnée par l'équation II.2.3. Une fois les estimateurs calculés pour chaque expérience, une quantité statistique, le *T-score*, est alors définie afin de juger l'écart du modèle avec les données, en prenant en compte à la fois la qualité de l'ajustement et la valeur du coefficient. Il est défini ainsi :

$$T = \frac{\widehat{\beta}}{\sqrt{\frac{\widehat{\epsilon}^2}{n}}}$$

où les $\widehat{\ }$ désignent les estimateurs des quantités correspondantes. À chaque neurone est associé un *T-score* par régresseur.

On choisit de grouper toutes les données à gradient de même signe (toutes les expériences "chaudes" d'un côté, toutes celles "froides" de l'autre), indépendamment de l'amplitude du gradient. Pour chaque expérience de même gradient, on procède à la régression multilinéaire, en recalculant à chaque fois les régresseurs. On obtient une série de *T-scores* que l'on standardise en $z - score$ (soustraire la moyenne et diviser par l'écart-type). On sélectionne ensuite les $z - scores$ supérieurs à deux écart-types de leur distribution, qui, étant approximée par une gaussienne, correspond à l'intervalle 95%. L'étude des signaux moyens issus des neurones retenus ne convainc pas de la qualité de la régression. En effet, si certains signaux semblent correspondre à leur régresseur, d'autres sont complètement désaccordés. De plus, la régression pour les températures froides sous-estiment le nombre de neurones répondant. L'examen des films bruts ainsi que la courbe bleue de la figure II.24 indiquent qu'un grand nombre de neurones semblent recrutés lors des stimulations à gradient négatif, or, la régression indique une réponse plus forte lors des stimulations chaudes. Cela est probablement du au fait qu'après convolution avec le noyau calcique, les régresseurs se ressemblent beaucoup (voir figure II.26) et de fait l'orthogonalisation de ces derniers peut produire des résultats inattendus. L'inexploitabilité de la méthode multilinéaire en l'état m'a conduit à utiliser une méthode mathématiquement proche, celle

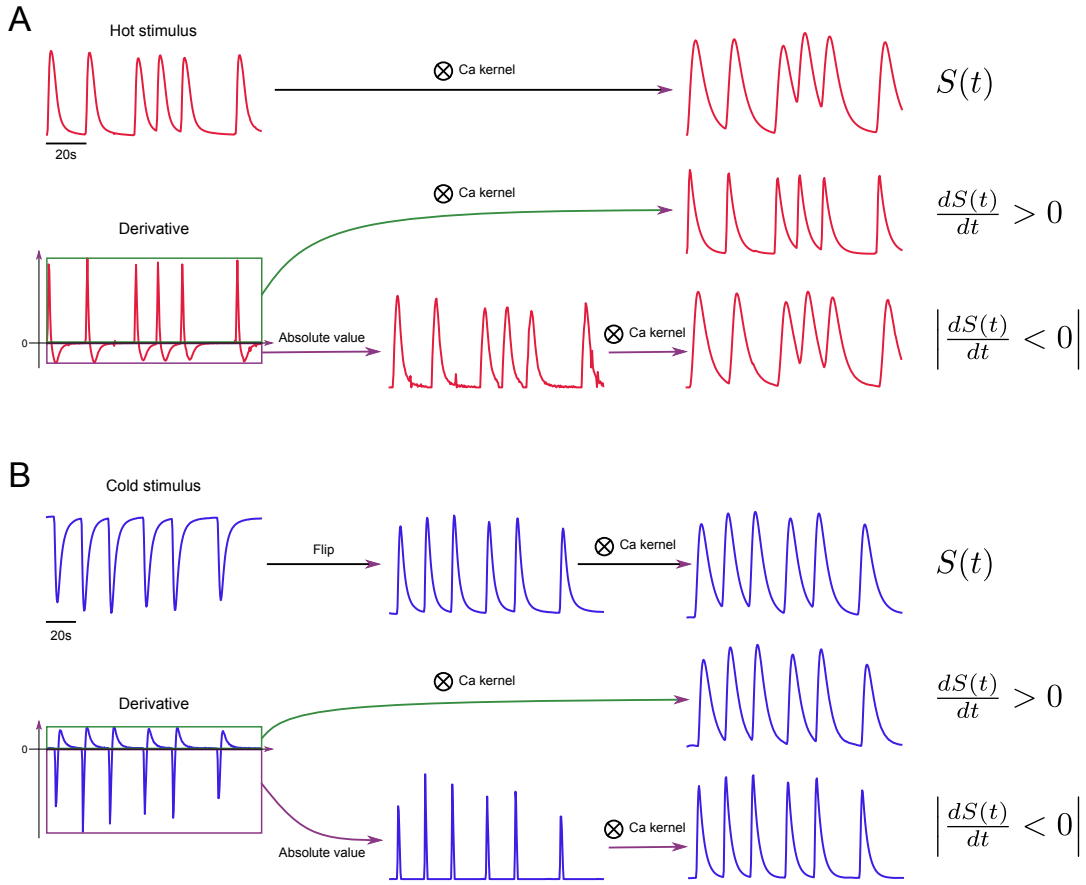


Fig. II.26 *Évaluation des régresseurs pour la stimulation à gradient positif (**A**) et négatif (**B**). **A** Pour les stimulations à gradient positif (chaudes), la trace est convoluée avec le noyau calcique (Ca kernel). La dérivée est calculée puis la partie positive (vert) est convoluée, de même que la valeur absolue de la partie négative (violet). **B** Pour les stimulations à gradient négatif (froides), la trace est d'abord retournée avant convolution. La dérivée est traitée de la même façon que pour les stimulations chaudes.*

du calcul du coefficient de corrélation de Pearson, avec laquelle les régresseurs sont traités indépendamment.

Le coefficient de corrélation de Pearson est une valeur comprise entre -1 et 1, quantifiant la prédominance de la relation affine existante ou non entre deux échantillons, défini ainsi :

$$R_{X,Y} = \frac{\mathrm{cov}(X,Y)}{\sigma_X \sigma_Y}$$

avec σ_i l'écart-type de l'échantillon i. Une corrélation de 1 indique une relation positivement linéaire parfaite entre X et Y ($Y \propto X$) tandis qu'une valeur de -1 indique une anti-corrélation parfaite ($Y \propto -X$). Ici, les régresseurs sont donc traités indépendamment, et pour chaque trace de $\Delta F/F$, on calcule son coefficient de corrélation avec chacun des régresseurs définis ci-dessus. Les distributions de ces coefficients sont montrées dans la colonne de gauche de la figure II.27 pour les gradients positifs et de la figure II.28 pour les gradients négatifs.

Pour les stimulations chaudes, les coefficients sont centrés en 0, indiquant que des populations de neurones distinctes répondent directement à la stimulation ($R > 0$) tandis que d'autres voient leur activités réprimés pendant la stimulation ($R < 0$). À l'inverse, pour les stimulations, froides, les coefficients sont majoritairement positifs, suggérant une forte réponse impliquant une majorité de neurones.

Pour localiser les neurones les plus corrélés avec la stimulation, on choisit arbitrairement de ne sélectionner que les 3% des neurones avec les coefficients les plus grands, en valeur absolue (97e centile de la valeur absolue de R, représenté par les barres rouges dans les figures II.27 et II.28). Chaque neurone retenu est alors projeté dans l'espace de coordonnées de l'atlas ZBrain, avec une couleur encodant la valeur du coefficient (bleu pour les coefficients négatifs et rouge pour les coefficients positifs) et une transparence de 0.04. Ainsi, une région totalement opaque contient 40 neurones ou plus. Les cartes sont présentées dans la colonne de droite des figures II.27 (chaud) et II.28 (froid). Cette opération est répétée, pour le chaud et pour le froid, pour chaque régresseur : la stimulation (A), la partie positive de la dérivée (B) et la partie négative de la dérivée (C). Les régions mentionnées ci-dessous sont montrées dans la figure I.3 et rappelées dans la figure II.29.

La première chose remarquable est que la réponse est dispersée à travers l'ensemble du cerveau, comme noté par M. Haesemeyer *et. al.* [75]. Pour le chaud, on peut identifier des groupes de neurones corrélés avec la stimulation brute (figure II.27A) aux centres des rhombomères 4 à 6 correspondant probablement aux clusters identifiés dans [75]. La partie ventrale du cervelet (*cerebellum*, voir figure I.3) présente également un *cluster* de neurones corrélés, une région impliquée notamment dans l'apprentissage et la prise de décision [107]. Un cluster dans la partie dorsale des deux côtés de l'habenula est

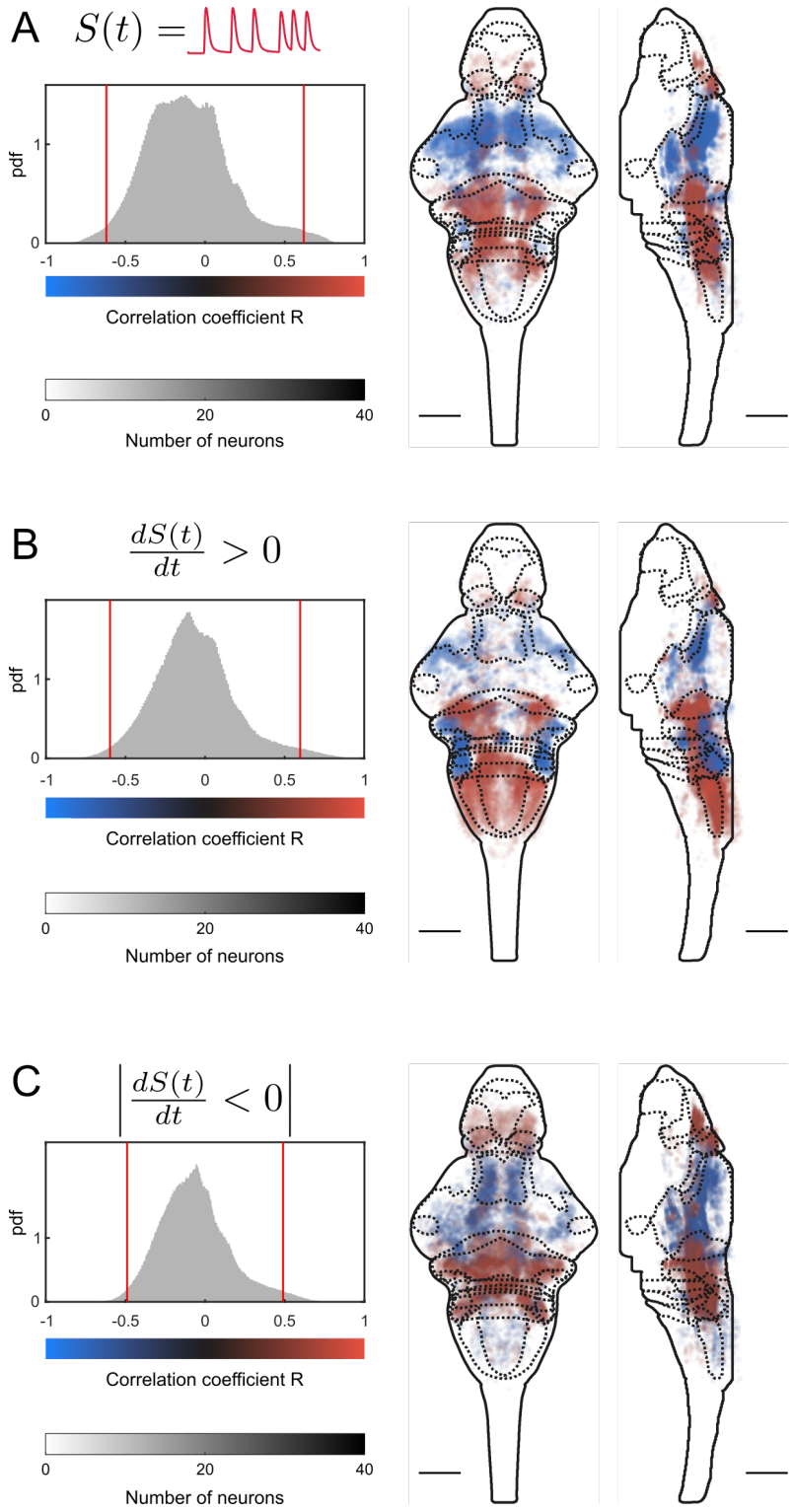


Fig. II.27 *Cartes de réponse au chaud. Barres d'échelle : 100µm.*

également révélé. L'habenula est une région hautement multi-sensorielle qui joue un rôle crucial dans les processus de peur [108], de passivité [109] et dans la directionnalité des prises de décision [110]. Les neurones dont l'activité est corrélée à une augmentation de la température (figure II.27B) sont essentiellement situés dans le cervelet et dans la partie caudale du rhombencéphale, tandis que l'activité des neuropiles autour des oreilles est anti-corrélée. Enfin, la distribution des neurones révélés par une décroissance de la température (figure II.27C) ressemble à celle correspondant à la stimulation brute, avec néanmoins un renforcement de la corrélation dans le pallium, une région intervenant potentiellement dans les processus d'habituation [111], et de l'anti-corrélation dans le pretectum.

La corrélation avec la stimulation froide est massive. Les coefficients sont majoritairement positifs, avec une moyenne au dessus de 0.5. Pour la réponse globale à la stimulation (figure II.28A, notez que la stimulation est en fait inversée, voir équation II.2.3), de fortes corrélations sont observées dans l'habenula, le tectum optique et dans le cervelet, ainsi que deux bandes traversant les rhombomères. Ce schéma est conservé pour la réaction à une augmentation de la température (figure II.28B), à l'exception de l'apparition de deux clusters symmétriques dans le cervelet fortement anti-corrélés, les seules anti-corrélations que l'on peut observer. Enfin, pour la diminution de la température (figure II.28C), on observe deux grands clusters dans le tectum optique et dans les neuropiles autour des oreilles.

Des exemples de traces d'activité provenant des différentes régions susmentionnées pour un poisson sont montrés en figure II.29.

L'effet de l'amplitude du gradient est quantifié en analysant les coefficients de corrélation pour le régresseur correspondant à la stimulation brute pour chaque expérience et moyenné sur tous les neurones comme montré dans la figure II.30. Cette mesure quantifie le déplacement des distributions montrées dans les figures II.27 et II.28, traduisant le nombre de neurones recrutés pendant la stimulation. On remarque une diminution du coefficient de corrélation avec l'amplitude des gradients négatifs. Pour les gradients positifs, une majorité de poissons montre une moyenne du coefficient de corrélation R négative, suggérant une répression de l'activité d'un grand nombre de neurones due à la stimulation, mais l'amplitude du gradient ne semble pas avoir d'effet sur cette quantité.

On peut ensuite comparer la fraction des neurones les plus positivement corrélés avec chaque régresseur par diverses régions regroupant l'ensemble du cerveau que l'on image, en distinguant le froid du chaud, comme montré en figure II.31. On y observe que pour les stimulations chaudes, la réponse est étalée sur l'ensemble du cerveau, quelque soit la modalité (température, augmentation ou diminution), sans pouvoir identifier une zone plus spécifique. En revanche, les réponses à une diminution de la température sont majoritai-

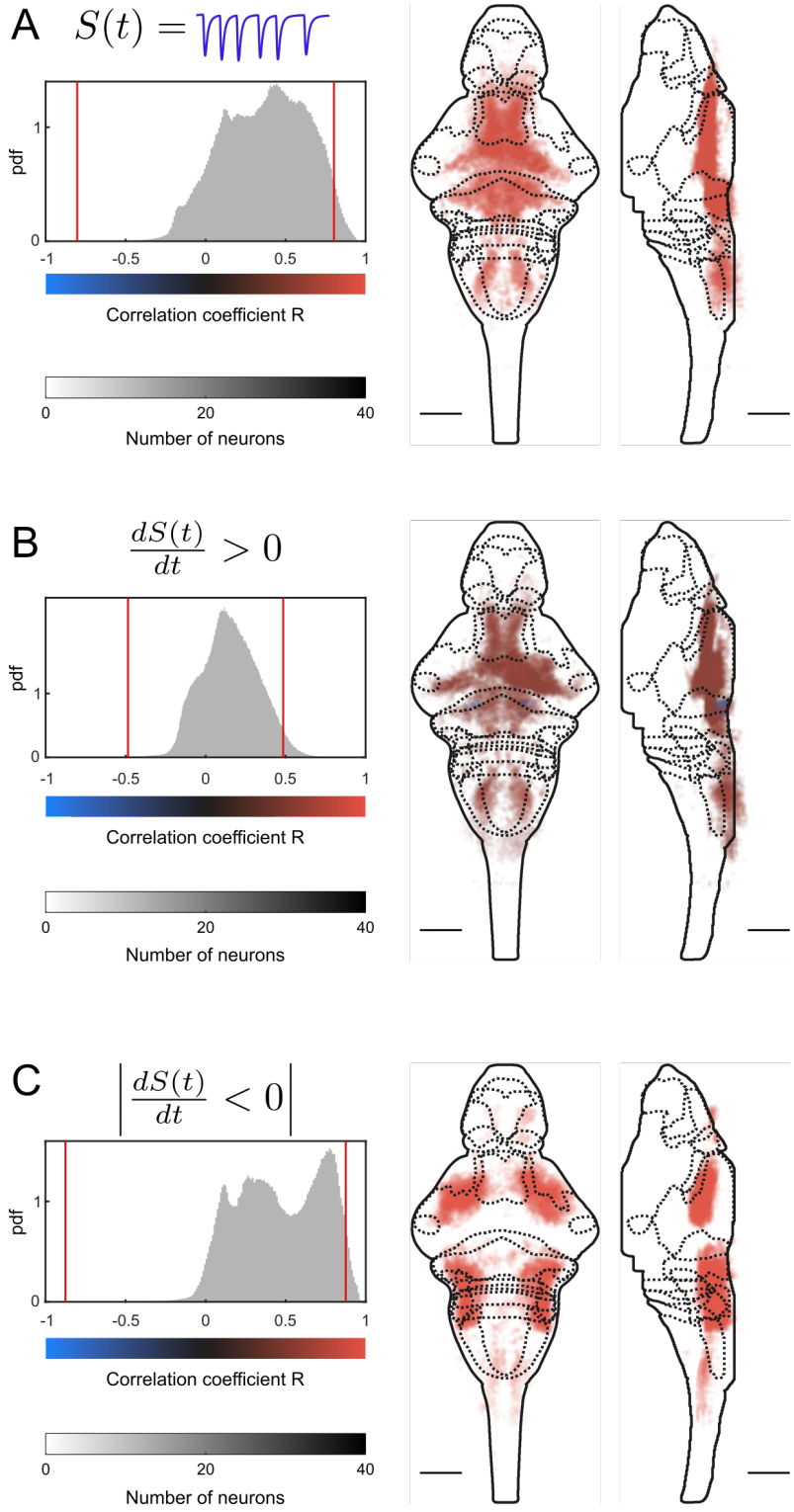


Fig. II.28 *Cartes de réponses au froid. Barres d'échelle : 100µm.*

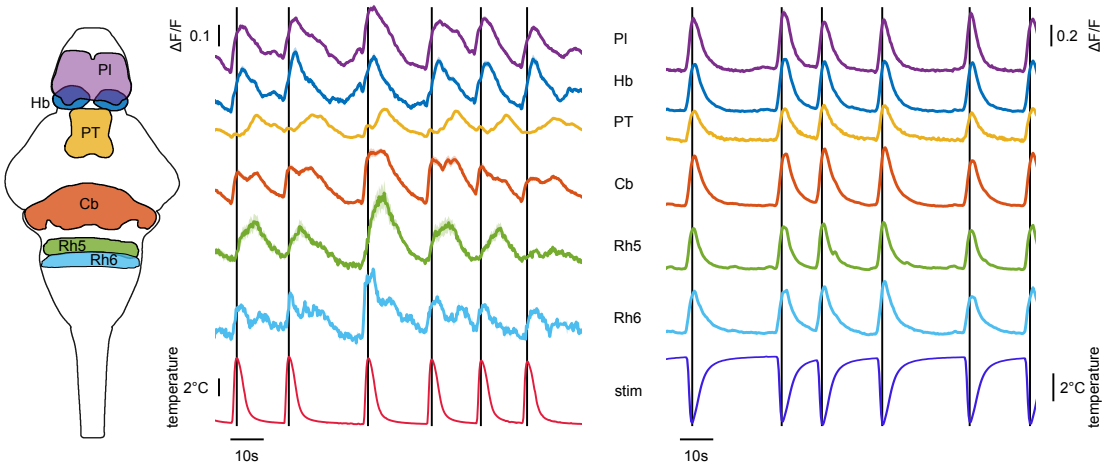


Fig. II.29 *Exemples de réponses par régions pour deux poissons, à une stimulation chaude (gauche) et froide (droite). Le schéma à gauche représente les régions dont l'activité des neurones répondants est moyennée. Pl : pallium, Hb : habenula, PT : pretectum, Cb cervelet, Rh rhombomere. stim : stimulation.*

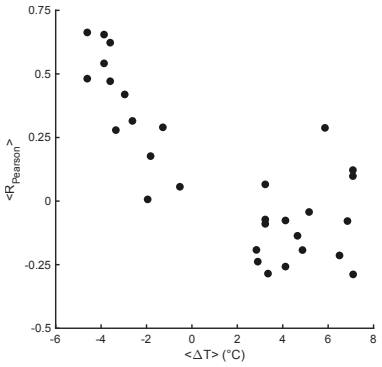


Fig. II.30 *Effet de l'amplitude du gradient. Moyenne sur tous les neurones des coefficients de corrélation avec le régresseur correspondant à la stimulation brute $S(t)$ pour chaque expérience.*

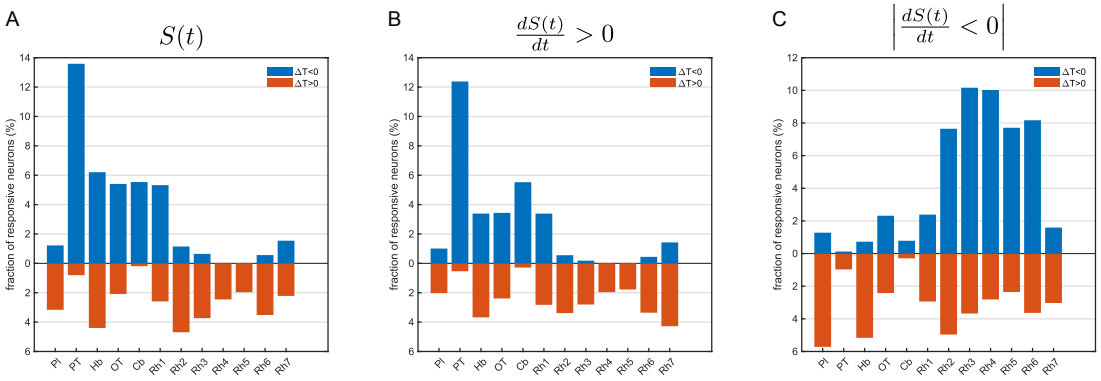


Fig. II.31 *Fractions de neurones répondant à la stimulation par régions.* ***A-C*** *Fraction de neurones répondant aux stimulation chaudes (rouge) et froides (bleu), pour chaque régresseur : (**A**) la stimulation brute, (**B**) partie positive de la dérivée et (**C**) la partie négative de la dérivée. Un neurone est considéré comme répondant si son coefficient de corrélation est supérieur au 97e centile de tous les coefficients. Pl : pallium, PT : pretectum, Hb : habenula, OT : tectum optique, Cb cervelet, Rh rhombomere.*

rement représentées dans la partie caudale de l'animal, dans le rhombencéphale, tandis que l'augmentation de la température semble sur-représentée dans la partie rostral, dans le mésencéphale.

Il est remarquable qu'on ne puisse pas dresser de parallèle fonctionnel entre chaud et froid : les régions potentiellement impliquées dans la perception d'une augmentation ou d'une diminution de la température ne sont pas les mêmes selon que la stimulation est chaude ou froide, suggérant que des circuits radicalement différents sont impliqués selon la température absolue. Qualitativement, on peut même voir une sorte de complémentarité entre les cartes de réponse au chaud et au froid.

II.3 Conclusions

On s'est intéressé jusqu'ici à l'effet d'un gradient thermique sur la larve de poisson-zèbre. D'une part, on a déterminé la préférence de cet organisme pour une plage de température de 22–28°C, puis on a caractérisé l'effet d'une variation de température sur les statistiques du mouvement suivant, posant les bases de la description de la tactique utilisée par l'animal pour naviguer dans un gradient de température.

D'autre part, un dispositif permettant d'imposer des stimulations thermiques à une larve de poisson-zèbre immobilisée sous un microscope à nappe de lumière a été décrit. Il a

permis de dresser des cartes de réponse au chaud, précisant des résultats publiés au cours de ma thèse par un autre groupe [75] présentés en introduction (I.4.2) et, pour la première fois, au froid. Une diminution de la température en partant de 22°C provoque une réaction intense dans l'ensemble du cerveau, avec des régions particulièrement impliquées. Les différences observées dans les réponses au chaud et au froid peuvent paraître surprenante puisqu'en comportement, les réactions vis-à-vis du gradient semblaient plus symétriques, sauf pour la réorientation. Il faut cependant rappeler que dans nos expériences d'imagerie fonctionnelle, la larve est entièrement immobilisée, tous les retours dans la boucle sensorimotrice à l'œuvre en nage libre sont ici supprimés. De plus, la température de base, 22°C, correspond à la limite basse de la plage de température préférentielle. Une diminution accrue de la température peut donc potentiellement activer des circuits qui ne le seraient pas dans la stimulation chaude. De plus, l'amplitude des stimulations est très grandes (1–3°C) devant celles ressenties par l'animal pendant un mouvement lors des expériences de comportement (de l'ordre de 0.1°C). La très forte augmentation de l'activité observée est ainsi peut-être due à un effet de panique, voir de nociception.

Le protocole de stimulation froide utilisé ici présente donc des inconvénients : la température de base déjà froide pour le poisson par rapport à sa température de préférence (22°C par rapport à ∼26°C) et l'amplitude éthologiquement trop élevée compliquent l'interprétation des résultats. Il faudrait donc réduire l'amplitude des gradients thermiques appliqués et refaire ces expériences en partant d'une température de base correspondant à la température préférentielle, permettant alors une comparaison symétrique chaud/froid, en lien avec les observations comportementales. Le contrôle fin de la température, en amplitude comme en temps, reste un défi, surtout si l'on veut aussi pouvoir refroidir le système. Disposer d'une méthode de stimulation qui permet de chauffer et refroidir précisément l'eau autour de l'animal (avec une précision supérieure à 0.1°C en moins d'une seconde) ouvrirait également la voie à des protocoles de rétro-action. Ces derniers consistent à imager le comportement d'une larve immobilisée (mouvement des yeux et/ou de la queue) et adapter la stimulation en fonction de la sortie moteur du sujet. Ainsi, on peut être capable de simuler un gradient virtuel, en modulant la température en fonction de si la larve essaie d'avancer ou de tourner dans l'une ou l'autre direction, offrant alors un parallèle direct entre les expériences sous gradient en nage libre et en imagerie calcique fonctionnelle.

En l'état, une analyse temporelle manque également. Pour aller plus loin dans la compréhension des circuits responsables de la thermoception, il faudrait analyser plus finement les réponses des neurones individuels, et par exemple les regrouper par délai de réponse pour identifier la hiérarchie temporelle du traitement du signal thermique, pour inférer l'ensemble des circuits impliqués.

Cependant, pour gagner en visibilité dans une configuration symétrique froid/chaud en partant de 26°C, il faudrait avoir une idée précise de la dynamique à la fois comportementale et neuronale à cette température, et plus largement, comprendre l'effet de la température de l'eau sur l'activité du poisson. De plus, dans l'étude présentée ici, tous les poissons sont systématiquement regroupés pour une analyse générale. La comparaison d'un poisson à l'autre révèle une grande variabilité d'individu en individu, mais aussi d'essai en essai pour le même animal.

Si les expériences de comportement décrite dans la section II.1.3 suggèrent une franche modulation des paramètres cinématiques par la température, une description quantitative et systématique des statistiques locomotrices en fonction de la température manque. De même, l'effet de la température sur l'activité cérébrale spontanée de larve de poisson-zèbre n'a jamais été étudiée. Ce sont ces vides que l'on contribuera à combler dans le chapitre suivant.

Chapitre III

Activité spontanée

La plupart des êtres vivants sont constamment actifs, même en l'absence de stimulation. C'est le cas des larves de poisson-zèbre, qui, même seules dans une boîte de pétri, se meuvent continuellement, explorant sans relâche leur environnement. Cette activité spontanée, autogénérée par l'organisme est cruciale : elle définit l'état interne de l'animal et donc sa réponse à un éventuel stimulus [3]. Il en résulte une grande variabilité, à la fois en comportement et dans l'activité neuronale. En effet, les stimulations externes ont tendance à favoriser certains types de comportement, en revanche, en l'absence de ceux-ci, chaque individu est "libre" d'explorer son environnement et est capable de moduler ses statistiques locomotrices avec moins de contraintes.

Dans ce chapitre, on se propose dans un premier temps de décrire de manière systématique la navigation spontanée de la larve de poisson-zèbre pour extraire un indicateur représentatif des états comportementaux. La température est ici utilisée comme levier pour caractériser la modulation de ces états. Ensuite, l'imagerie calcique fonctionnelle est utilisée pour enregistrer l'activité d'un circuit neuronal identifié comme étant impliqué dans la réorientation de l'animal. L'effet de la température sur la dynamique de cette population de neurones est quantifiée et modélisée par un modèle d'Ising.

III.1 Variabilité et modulation thermique des statistiques locomotrices

L'ensemble de cette section a été rapportée dans une publication, intitulée *Thermal modulation of Zebrafish exploratory statistics reveals constraints on individual behavioral variability* [84] et parue dans BMC Biology. Les résultats sont résumés ci-dessous et l'article est disponible en section III.1.2.

III.1.1 Résumé

Le dispositif expérimental utilisé est le même que celui décrit à la section II.1.1, sauf qu'ici aucun gradient n'est imposé. Dix larves de poisson-zèbres âgées de 5 à 7 jours post-fécondation sont placées dans le bassin et après une période d'habituation de 10 minutes, elles sont filmées pendant 30 minutes pendant qu'elles nagent dans une eau à température constante. Pour chaque lot de 10 poissons (10 lots au total), jusqu'à 5 températures sont testées : 18, 22, 26, 30 et 33°C, couvrant l'intervalle de températures non-nocives pour les animaux [70]. Les films sont traités avec le logiciel FastTrack pour extraire les positions et orientations de tous les objets sur chaque images, comme décrit en section II.1.2. Les paramètres cinématiques définis en section II.1.2 et illustrés en figure I.4 sont calculés pour chaque mouvement de chaque trajectoire. On s'intéresse par la suite aux statistiques de ces paramètres dans le cadre de la nage spontanée et sur l'effet de la température du bain sur ces statistiques.

Remarque : dans la suite, les références aux figures sont celles de l'article situé dans la section III.1.2.

Modulation des distributions des paramètres Les distributions moyennes des intervalles inter-battements (IBI), déplacements et angles de réorientation sont montrées en figure 2B-D. On observe un étalement des IBI plus important à basse température, indiquant une augmentation des pauses quand l'eau est froide. Les moyennes des distributions, montrées en figure 2F, révèlent deux régimes : 18–22°C et 26–33°C. La même tendance est observée pour le déplacement (figure 2C et 2G), avec une augmentation significative du déplacement à haute température (supérieure à 26°C).

On observe un étalement plus important des distributions de la réorientation $\delta\theta$ (figure 2D), avec l'apparition d'un épaulement autour de 50°. On a vu dans la section I.3.2 que ces distributions permettaient de classer les mouvements (tournants ou tout-droit) et de calculer la fraction des mouvement de type "tournant", ainsi que l'amplitude des angles qui leur est associé, qui augmentent toutes deux linéairement avec la température (figure 2E et 2H, respectivement).

La dynamique de réorientation est impactée par la température La structure orientationnelle de la nage de la larve de poisson-zèbre peut être décrite par deux chaînes de Markov indépendantes [48], comme illustré par la figure 3A. La première détermine si le poisson va tout droit (*forward*, F) ou s'il tourne (*turn*, T). Dans ce dernier cas, la deuxième chaîne fixe la direction du tournant, droite (*right*, R) ou gauche (*left*, L). À chaque battement, chaque chaîne peut soit rester dans le même état soit en changer, avec les probabilités indiquées dans la figure 3A.

La probabilité de changer de direction, notée p_{flip}, joue un rôle crucial dans les processus exploratoires [48]. Un p_{flip} inférieur à 0.5 signifie que le poisson a peu de chance de changer de direction au mouvement suivant, ce qui se traduit par un enchaînement de mouvement dans la même direction (ponctué de mouvements allant tout droit). Au contraire, une probabilité de 0.5 indique une équiprobabilité d'aller à droite ou à gauche, ce qui correspond à une marche aléatoire classique, non biaisée et non persistante. L'augmentation de la température semble rapprocher le poisson de cet état, où p_{flip} vaut 0.45 à 33°C (figure 3C), révélant une décorrélation de la direction de la nage. L'homologue temporel de p_{flip}, noté k_{flip}, qui correspond à un taux de changement de direction et exprimé en s^{-1}, peut-être estimé par $p_{flip}/\langle \delta t \rangle$ (figure 3F).

Couplage des paramètres cinématiques Les 5 paramètres précédemment décrits, nommément le délai inter-mouvement, le déplacement, l'amplitude de réorientation, la probabilité de tourner et la probabilité de changer de direction, permettent de décrire la dynamique d'exploration.

Si les paramètres sont décorrélés entre eux à court terme (à l'échelle du mouvement individuel, figure S1A), les moyennes calculées à l'échelle d'une trajectoire (ordre de grandeur de la dizaine de secondes) sont statistiquement couplées, comme le montrent les matrices de corrélations de la figure 4B. Cela se traduit par des "types" de trajectoires : tortueuse et rapide ou au contraire plus lentes avec peu de réorientations, comme illustré dans la figure 4A. Une analyse en composante principale (*principal components analysis*, PCA) montre que les deux premières composantes principales (PC) expliquent la majorité de la variabilité observée dans les paramètres par trajectoire. De plus, la température ne semble pas avoir d'effet sur la structure du couplage, comme le montrent les figures 4D-E qui montrent les coefficients des deux premières PC. Une PCA sur les moyennes par température montre une structure similaire : tous les paramètres augmentent avec la température à l'exception de l'intervalle inter-mouvement qui diminue. Cela suggère que ces paramètres sont intrinsèquement corrélés, indépendamment de la température. L'espace formé par les deux premières PC définit un espace comportemental qui détermine le type de trajectoire, et la température déplace le répertoire accessible à l'animal comme le montre les projections des données dans cet espace (figure 4F). Ces répertoires se recouvrent partiellement, expliquant pourquoi on peut toujours observer des trajectoires plus typiques d'une température basse à haute température, mais celles-ci seront moins fréquentes.

Exploration lente de l'espace comportemental Pour caractériser la dynamique de l'exploration de ces espaces comportementaux, une nouvelle série d'expériences a été

conduite, expériences dans lesquelles les trajectoires d'un poisson unique sont enregistrées pendant 2h à 26°C, ce qui permet de suivre le comportement sur une longue période.

L'observation des trajectoires du même poisson révèle que le type de trajectoire change selon l'époque (figure 5A). La même analyse de PC permet de voir la dépendance en temps des projections des paramètres dans l'espace comportemental (figure 5D), ce qui montre que le poisson change effectivement de régime sur des temps longs.

Pour estimer l'échelle de temps sur laquelle cette exploration se déroule, une simulation numérique ajustée aux données d'un processus d'Ornstein-Uhlenbeck, qui décrit la diffusion d'un agent dans un puits de potentiel, permet de montrer que les changements d'état exploratoire de la larve de poisson-zèbre est un phénomène diffusif lent dans un espace contraint qui se déroule sur des temps supérieurs à la demi-heure (figure 5E-F).

Enfin, cette analyse à un seul poisson permet de préciser que plus de 60% de la variabilité totale observée pendant les expériences à plusieurs poissons trouve son origine dans la variabilité intra-individuelle, c'est à dire la modulation des états internes de chaque poisson (figure S2D).

Thermophobicité sans gradient Pour vérifier le bien-fondé de notre approche qui consiste à réduire la locomotion de la larve à seulement 5 paramètres, des simulations de la nage d'un agent basées sur les distribution empiriques de ces 5 paramètres ont été réalisées. Ces simulations capturent correctement la dynamique exploratoire, comme le révèle le bon accord entre données et simulations sur les courbes de déplacement quadratique moyen, linéaire (MSD, $\langle d^2 \rangle$, figure 6B) et angulaire (MSR, $\langle \delta\theta^2 \rangle$, figure 6C). Cela suggère que ces 5 paramètres sont suffisants pour une description correcte de la locomotion.

On peut également essayer de savoir si la modulation des distributions par la température revêt un intérêt stratégique. Pour cela, on utilise les simulations décrites ci-dessous mais où l'agent simulé navigue dans un gradient virtuel. Les distributions dans lesquelles sont échantillonnées les paramètres sont mises à jour à chaque mouvement conformément à la température à laquelle se trouve le poisson virtuel. Les distributions de présence montrent que dans ce cadre, les poissons évitent les hautes températures pour se confiner vers les zones froides, même pour des gradients très faibles où un poisson réel ressentirait une différence de 0.015°C en un mouvement (figure 6E-F). Si un mécanisme reposant sur le traitement du gradient lui-même est nécessaire pour expliquer la répulsion provoquée par les basses températures observée dans les données (figure S4), la modulation basée uniquement sur la température absolue représente un mécanisme complémentaire efficace pour éviter les zones trop chaudes.

Conclusion Cette étude fournit une description minimale de la nage de la larve de poisson-zèbre. Elle offre une description quantitative de l'effet de la température sur les statistiques de locomotion, en proposant une méthode de traitement de la variabilité des paramètres comportementaux. Une caractérisation de la modulation lente de l'état interne de l'animal est présentée, qui est définit ici par le biais d'un espace comportemental accessible bien défini que le poisson explore de manière diffusive. L'effet de la température sur les paramètres cinématiques est expliqué par un déplacement dans cet espace, faisant de la température un levier pour l'étude de la variabilité.

III.1.2 Article

Le Goc *et al. BMC Biology* (2021) 19:208
https://doi.org/10.1186/s12915-021-01126-w

BMC Biology

RESEARCH ARTICLE Open Access

Thermal modulation of Zebrafish exploratory statistics reveals constraints on individual behavioral variability

Guillaume Le Goc[1], Julie Lafaye[1], Sophia Karpenko[1,2,3], Volker Bormuth[1], Raphaël Candelier[1] and Georges Debrégeas[1*]

Abstract

Background: Variability is a hallmark of animal behavior. It contributes to survival by endowing individuals and populations with the capacity to adapt to ever-changing environmental conditions. Intra-individual variability is thought to reflect both endogenous and exogenous modulations of the neural dynamics of the central nervous system. However, how variability is internally regulated and modulated by external cues remains elusive. Here, we address this question by analyzing the statistics of spontaneous exploration of freely swimming zebrafish larvae and by probing how these locomotor patterns are impacted when changing the water temperatures within an ethologically relevant range.

Results: We show that, for this simple animal model, five short-term kinematic parameters — interbout interval, turn amplitude, travelled distance, turn probability, and orientational flipping rate — together control the long-term exploratory dynamics. We establish that the bath temperature consistently impacts the means of these parameters, but leave their pairwise covariance unchanged. These results indicate that the temperature merely controls the sampling statistics within a well-defined kinematic space delineated by this robust statistical structure. At a given temperature, individual animals explore the behavioral space over a timescale of tens of minutes, suggestive of a slow internal state modulation that could be externally biased through the bath temperature. By combining these various observations into a minimal stochastic model of navigation, we show that this thermal modulation of locomotor kinematics results in a thermophobic behavior, complementing direct gradient-sensing mechanisms.

Conclusions: This study establishes the existence of a well-defined locomotor space accessible to zebrafish larvae during spontaneous exploration, and quantifies self-generated modulation of locomotor patterns. Intra-individual variability reflects a slow diffusive-like probing of this space by the animal. The bath temperature in turn restricts the sampling statistics to sub-regions, endowing the animal with basic thermophobicity. This study suggests that in zebrafish, as well as in other ectothermic animals, ambient temperature could be used to efficiently manipulate internal states in a simple and ethological way.

Keywords: Behavior, Variability, Thermokinesis, Zebrafish, Navigation, Locomotion

*Correspondence: georges.debregeas@sorbonne-universite.fr
[1]Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Laboratoire Jean Perrin (LJP), Paris, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Variability, both inter- and intra-individual, is an ubiquitous trait of animal behavior [1]. Intra-individual variability may participate in efficient strategies, as best exemplified by the alternation of exploration and exploitation phases during foraging [2]. It can also endow the animal, or the population, with robustness, i.e., the ability to rapidly and efficiently cope with changing environmental conditions [3, 4]. The idea, known as bet-hedging, is that a modest loss in fitness associated with phenotypic variability could be balanced by the gain in leniency when facing unexpected and possibly hostile conditions. The origin of inter-individual variability may be attributed to genetic, epigenetic, or developmental differences. Intra-individual variability may in turn reflects spontaneous transitions between distinct brain states, i.e., patterns of persistent neural activity [5, 6]. It may also be the signature of endogenous modulations in the production of neuromodulators [7].

Although the functional significance of variability in animal behavior is now largely recognized [8], the way it is regulated and modulated by external cues, as well as its neuronal substrate remain elusive. To address this question, one not only needs to quantify variability, but also manipulate it in a physiologically relevant manner, in an animal that is accessible to both behavioral and neuronal circuit interrogation. Here, we used the zebrafish larva as a model vertebrate as it is uniquely amenable to in vivo whole brain functional imaging [9–11] and to high-throughput behavioral studies [12, 13].

As an ectothermic animal, zebrafish must actively navigate towards regions of its environment that are thermally optimal for its thriving [14], while potentially being exposed to a wide range of temperatures [15]. How fish swim in thermal gradients has been extensively studied [16], and the neuronal circuits underlying this thermotactic process have been identified [17]. Zebrafish larvae integrate thermal signals (change in temperature) over a sub-second time window, and adapt their forthcoming movement accordingly in order to eventually move towards optimal zones.

Here, we focus on the exploratory dynamics at various but spatially uniform temperatures. We use a reductive approach, as previously introduced [18], to quantify its spontaneous locomotion using a finite number of short-term kinematic parameters. We then quantify how the bath temperature not only impacts the mean of these parameters, but also their statistical distribution (variability) and pairwise covariance. We further assess the time-scale over which this behavioral variability unfolds at the level of individual animals. From this detailed analysis, we build a numerical model of zebrafish larvae navigation at all temperatures over the physiologically relevant range. Finally, we use this model to demonstrate how this thermal adaptation of spontaneous swimming pattern may complement the thermotactic mechanism, based on direct gradient sensing, in order for the animal to limit its presence in potentially harmful environments.

Results

A behavioral assay to record spontaneous navigation at different temperatures

Batches of 10 zebrafish larvae aged 5-7 days were video-monitored at 25 frames/second for periods of 30 min as they freely swam in a rectangular 100 × 45 × 4.5 mm^3 pool at a constant and uniform temperature (Fig. 1A, see "Methods" section). For each batch, we successively imposed up to 5 values of temperature (18, 22, 26, 30, and 33 °C) in a random order. This thermal range spans the non-lethal conditions for larval zebrafish and has been shown to be effectively encountered by the animal in its natural habitat [19]. Each 30-min-long recording session was preceded by a 14-min-long period of habituation to allow the animals to reach their steady-state exploratory regime. A total of 10 batches per temperature involving 170 different fish were used.

Larval zebrafish swim in discrete bouts lasting for about 100 ms, interspersed with $\sim$ 1–2 periods of rest. As we aim to probe how the bath temperature impacts the long-term exploratory process, we focus on the characterization of a few kinematic parameters associated with each bout. We thus ignore the fine structure of the swimming events, such as the amplitude of the tail deflection or beating frequency [20, 21] but examine their resulting heading reorientation and linear displacements. The center of mass coordinates and orientation of each larva in every frame were extracted using FastTrack [22] (see "Methods" section). For each identified swim bout, we computed three scalar parameters (Fig. 2A) whose statistics control the fish spatio-temporal exploration [18]: (i) the interbout interval (IBI), δt_n, is the idle time following the bout event; (ii) the displacement, d_n, is the traveled distance associated with the bout; and (iii) the reorientation angle, $\delta\theta_n$, denotes the change in heading direction.

Zebrafish larvae, as most animals, tend to adopt a distinct navigational behavior at proximity of boundaries [23]. Tracking was thus performed within the innermost region of the arena, at a minimum distance of 5 mm from the walls. As a result, individual fish were not tracked continuously over the entire recording periods, but along *trajectories* (from one wall to another). In the analysis, we ignored trajectories that last less than 25 s. Example trajectories for three temperatures are shown in Fig. 1C, where each dot indicates the location of a swim bout, while its size reflects the interbout interval. This comparison provides a first qualitative illustration of the effect of temperature on the fish exploration. At low temperatures (18 °C), the trajectories are relatively straight, comprising

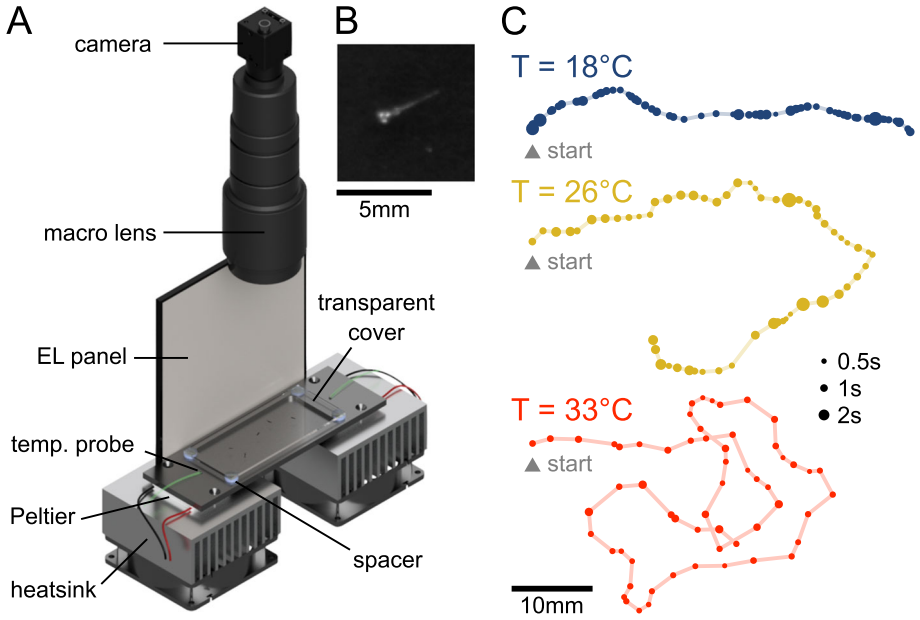


Fig. 1 Behavioral assay for the video-monitoring of spontaneous navigation of zebrafish larvae at different temperatures. **A** Sketch view of the setup: Larval zebrafish are freely swimming in a rectangular pool connected to a pair of Peltier modules in a light-tight box. The setup is illuminated with a white electroluminescent (EL) panel and a symmetrically positioned a mirror (not shown). The tank is covered with a transparent slide to limit evaporation. A CMOS camera records images at 25 frames/second. **B** Blow-up of a raw image around a larva. **C** Example trajectories extracted offline from movies recorded at different temperatures. Each dot represents a bout event, with size encoding the time spent at this location

a majority of small discrete forward bouts executed at relatively low frequency. At high temperatures, the trajectories appear much more meandering, with more frequent and ample reorienting maneuvers with longer traveled distances. In the following, we quantify these differences by systematically comparing the statistics of the per-bout kinematic parameters at different temperatures.

The bath temperature controls the statistical distributions of the kinematic parameters

For each batch and temperature, a probability density function (pdf) was computed for interbout intervals, displacements and turn angles by pooling all bout events. We then computed an average distribution across batches (Fig. 2B–D, respectively) for the 3 parameters, as well as the temperature-dependence of their mean values (Fig. 2F–H).

A decrease in the bath temperature from 26 to 18 °C is associated with an increase of the mean IBI ($\langle \delta t \rangle$) from 1 to 1.4 s, while the bout frequency remains essentially unchanged at higher temperatures (2B, F). This increase in the mean values is accompanied by a systematic broadening of the statistical distribution. The per-bout displacement exhibits a similar trend (Fig. 2C). This quantity increases in the range 18–26 °C from 1 to 1.5 mm, and remains unchanged at higher temperatures (Fig. 2G).

The turn angle distributions shown in Fig. 2D reveal the existence of two main bout categories [13, 18, 24]. The central narrow peak corresponds to forward bouts while the wide tail is associated with turning events. We adjusted this distribution as a sum of two empirically chosen functional forms in order to extract the fraction of turning bouts p_{turn} (see "Methods" section). This quantity steadily increases with the temperature, from 0.3 to 0.8 (Fig. 2E). This increase in the fraction of turning bouts comes with an increase in their associated reorientation angles $\delta\theta_{turn}$ as shown in Fig. 2H.

The bath temperature controls the persistence time of the orientational state

In a recent study [18], we showed that the orientational dynamics of zebrafish larvae can be described by two independent Markov chains (Fig. 3A). The first one controls the bout type selection, between forward scoots or turn bouts. This process is essentially memoryless, such that the transition rates are simply set by the ratio between either categories, namely p_{turn} and $1 - p_{turn}$. The second Markov chain controls the orientations of the turning bouts. When a turn bout is executed and if this chain is in the left (right) state, then the animal turns left (right, respectively). This second selection process has been shown to display a persistence over a few bouts: the

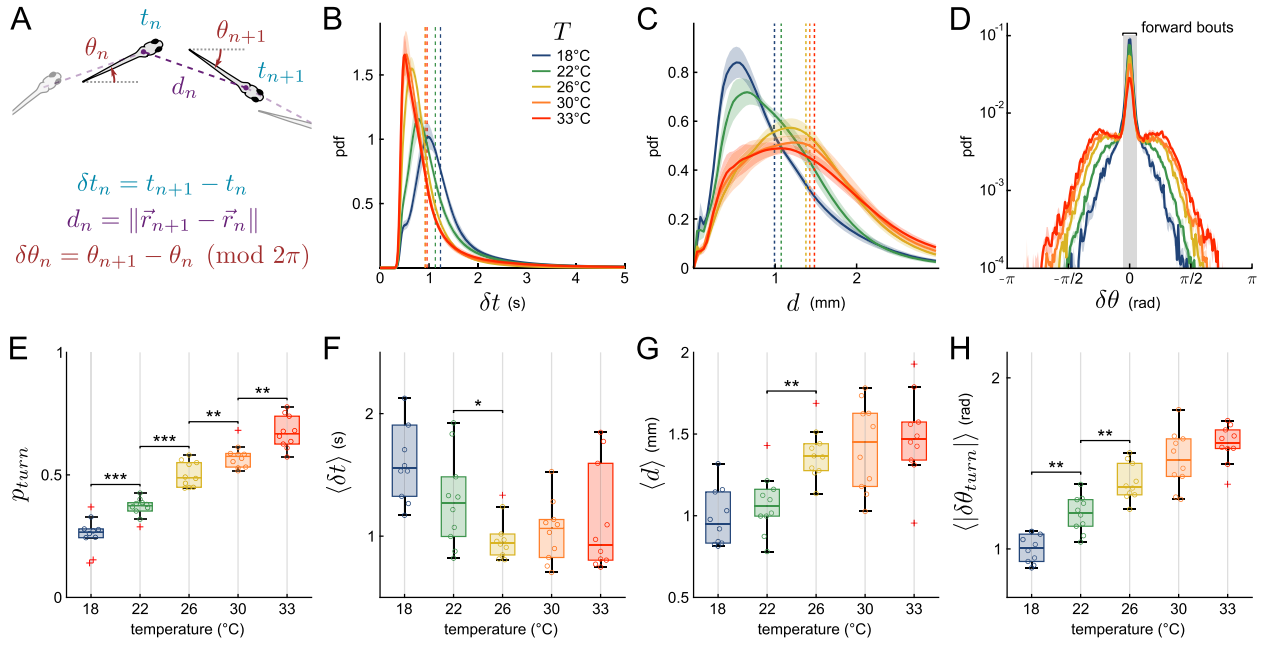


Fig. 2 Effects of bath temperature on spontaneous navigation. **A** Sketch defining three kinematic parameters. δt_n is the time elapsed between bout n and bout $n+1$, known as the interbout interval. The displacement d_n is the distance traveled during bout n (in mm), while $\delta\theta_n$ represents the reorientation angle. A small value around 0 corresponds essentially to a forward swim, while a large positive value (resp. negative) corresponds to a left (resp. right) turn. Per-batch averaged distributions of interbout intervals (**B**), displacements (**C**) and turn angles (**D**) for each tested temperatures. Vertical dotted lines are the means of the distributions, shaded areas are standard errors of the mean (s.e.m.). The gray area in **D** marks the forward events versus the turn events. **E**–**H** Boxplots of selected parameters. Each dot corresponds to a batch of 10 fish, the box spans the 25th to the 75th percentiles, the horizontal line is the median, red crosses are outliers. Significance given only for neighboring boxes (Kruskal-Wallis test, no star indicates $p > 0.05$, $^{\star}p < 0.05$, $^{\star\star}p < 0.01$, $^{\star\star\star}p < 0.001$). **E** Fraction of turns, referred to as the turning probability, defined as the ratio of turn bouts over the total number of bouts. **F** Means of the interbout intervals. **G** Means of the displacements. **H** Means of the absolute reorientation amplitude of turning bouts

fish tends to chain turn bouts that are similarly orientated [24–26], a mechanism whose result is to enhance the angular exploration [18].

Here, we examined how this motor-persistence mechanism is impacted by the bath temperature. We estimated the flipping rate p_{flip} — the probability to switch orientation at each bout — by first binning the turning angles into three categories (denoted Δ) and assigning a discrete value to each of them: right turn ($\Delta = -1$), forward bout ($\Delta = 0$) and left turn ($\Delta = +1$). We then computed the mean discretized angle value $\langle \Delta_{n+1} \rangle$ at bout $n+1$ for the three possible values of the previous bout Δ_n, as shown in Fig. 3B. The slope of the linear fit provides a measurement of p_{flip} (see "Methods" section and Eq. 1). This flipping probability increases with temperature from 0.22 at 18 °C to 0.45 at 33 °C (Fig. 3C), approaching 0.5. Hence, at high temperatures, the orientational persistence essentially vanishes, i.e., the probability to trigger a left *vs* a right turn becomes independent of the orientation of the previous bout. This increase of the flipping probability counteracts the concurrent increase in turning probability and turn bout amplitude at high temperature by limiting the tortuosity of the trajectories in these conditions.

This approach yields a typical number of bouts $1/p_{flip}$ over which the turning orientation is maintained. A complementary approach consists in characterizing the actual time-persistence (in seconds) of the orientational state [18]. To do so, we assume that the orientation selection is driven by a hidden two-state continuous signal, of which the turn bouts provide a stochastic sampling. We hypothesize that a forward bout is "transparent", i.e., it does not interfere with the persistence process, and that the orientational state remains unchanged until a bout in the opposite direction is executed. The procedure for reconstructing the orientational signal is illustrated in Fig. 3D.

For all trajectories, we computed the autocorrelation function (ACF, $R_{\Delta\Delta}$) of the reconstructed orientational signals, and averaged them for each temperature (Fig. 3E). The ACF shows a faster decay for higher temperatures, i.e., the time period over which the animal can maintain its orientational state is larger in colder water. The ACFs could be correctly adjusted with an exponential decay, a

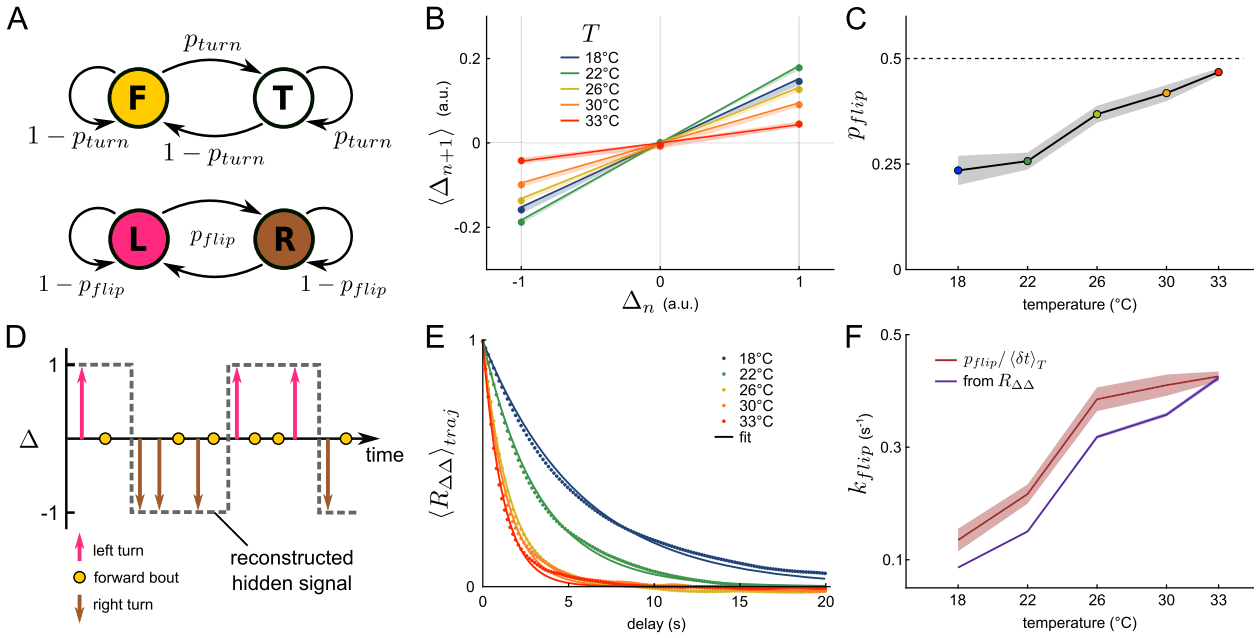


Fig. 3 The orientational dynamics is temperature-dependent. **A** Two discrete and independent Markov chains describe the reorientation dynamics. The first one (top) selects the bout type, either turn (T) or forward (F), given the transition rate p_{turn}, while the second one (bottom) determines if the fish is in the left (L) or right (R) state with a transition rate denoted p_{flip}. **B** Mean ternarized reorientation Δ of the next bout, given the current bout reorientation. Shaded area is the sem, solid line is the fit (Eq. 1). **C** Temperature dependence of p_{flip}. The dashed line at 0.5 indicates a memoryless process. **D** Schematic representing a motion sequence generated by the two discrete Markov chains. The hidden underlying orientational signal that sets the left/right state of the fish is exposed only when the fish performs a turning bout and can be estimated (dashed line) for each trajectory. **E** Trajectory-averaged autocorrelation function of Δ ($R_{\Delta\Delta}$) and associated fit (Eq. 2). **F** Temperature dependence of k_{flip}, extracted from two methods: p_{flip} divided by the mean interbout interval associated with each temperature (red, shaded area is the s.e.m.) and from the fit of the autocorrelation function (purple, error bar 95% confidence interval)

functional form that is expected for a simple telegraph process [27]. This suggests that the left/right transition over a time interval dt is simply given by $k_{flip}dt$, where k_{flip} is the transition rate from one state to another. From the exponential fit of the ACFs, we extracted k_{flip}, which we found to increase quasi-linearly with the temperature, as shown in Fig. 3F (purple line). The rate k_{flip} is the temporal counterpart of the per-bout flipping rate p_{flip}, the two quantities being linked through the interbout interval. Consistently, we found that $p_{flip}/\langle \delta t \rangle$ provides a good approximation of k_{flip} for all temperatures (Fig. 3F, red line).

Navigational kinematic parameters are statistically coupled

In the preceding sections, we showed that the bath temperature impacts in a systematic way the statistical distributions of the five kinematic parameters that control the fish spontaneous navigation, namely the interbout interval (IBI), turn amplitude, traveled distance, turn probability, and orientational flipping rate. When examining trajectories recorded at a given temperature, we noticed that they tend to fall in stereotypical categories reminiscent of those most often observed at various temperatures. Some trajectories are tortuous with short IBI, akin to typical hot water trajectories, while other appear to be straighter with less frequent bouts as generally observed in cold water (Figs. 4A and 1C). This is suggestive of the existence of a finite kinematic repertoire accessible to the animals whose relative occurrence may be controlled by the bath temperature.

To test this intuition, we first aimed at establishing the statistical constraints that could set this accessible repertoire. We thus examined the pairwise covariance of the aforementioned kinematic parameters. At short time scale (over one bout), we did not observe any significant correlation between the 3 parameters that can be evaluated on a per-bout basis (IBI, reorientation angle, and traveled distance, see Additional file 1: Figure S1A). However, when performing the same analysis on per-trajectory averages, we observed a robust covariance of the parameters. This is illustrated in Fig. 4B which shows the covariance matrices computed for all data and for each temperature. The IBI appears to be strongly anti-correlated with the forward displacement and the flipping rate. In contrast, besides

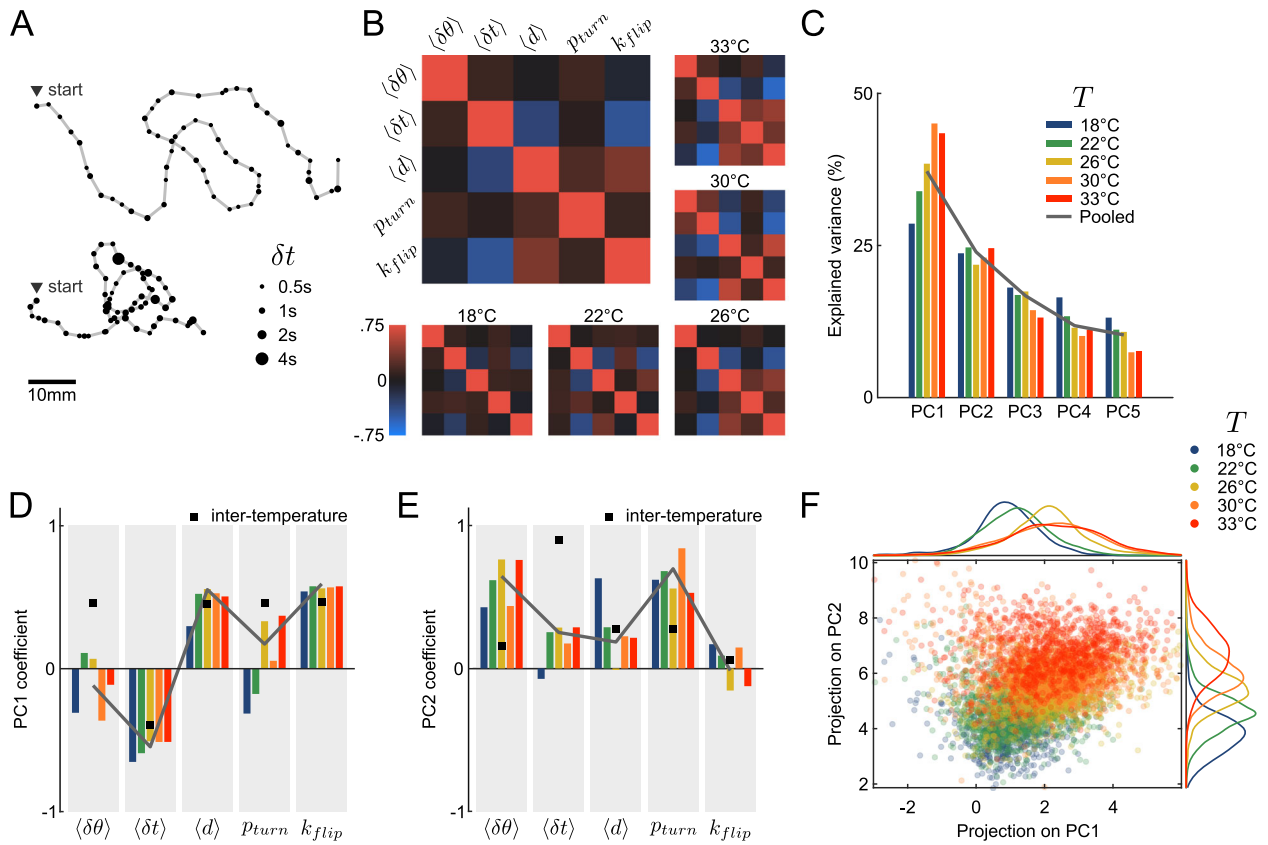


Fig. 4 Correlations between parameters are conserved across temperatures. **A** Two qualitatively different trajectories recorded at the same temperature (30 °C). **B** Pearson's correlation matrices of the average reorientation angle $\delta\theta$, interbout interval δt and displacement d, along with the turning probability p_{turn} and flipping rate k_{flip} defined for each trajectory, at different temperatures. Large panel: average over all temperatures. **C** Variance explained by each principal component of a PCA performed on each intra-temperature feature matrix. **D**, **E** Coefficients of the principal components for intra-temperature matrices (colors), for the inter-temperature averaged matrix (black square) and for the pooled per-temperature array (solid line). **D** First principal component (PC1), **E** second principal component (PC2). **F** All per-trajectory values projected into the principal component space (first two PCs), and their associated marginal distributions for each principal vector

IBI, all pairs of parameter tend to exhibit positive correlations. Importantly, these statistical features are conserved across the entire temperature range.

Temperature controls the distribution probability within a well-defined locomotor repertoire

We sought to evaluate how this intra-temperature covariance of the navigational parameters aligned with the inter-temperature covariance. To do so, we used the temperature-averaged parameters to build a 5 temperatures by 5 parameters matrix from which we computed an inter-temperature Pearson correlation matrix (Additional file 1: Figure S1B). The latter displays a comparable structure as the mean intra-temperature correlation matrix 4B: as we have shown in the previous sections, all parameters increase with temperature, and are thus positively correlated, except for the interbout interval which decreases with the temperature and is therefore anti-correlated with the 4 other parameters.

Hence, intrinsic variability and temperature-induced behavioral changes both reflect a concerted modulation of the kinematic parameters along a similar axis. To confirm this claim, we performed a principal component analysis on both the inter-temperature and intra-temperature data. For all temperatures, the first principal component (PC) explains 28 to 45% of the intra-temperature variance (Fig. 4C), i.e., significantly more than expected for independent parameters (20%). Due to the small size of the inter-temperature matrix (5 samples), the first PC explains more than 90% of the inter-temperature variance (Additional file 1: Figure S1C). The first PC is conserved across the temperature range (Fig. 4D, colored bars) and essentially aligned with the inter-temperature PC (black squares). The second PC is similarly conserved across temperatures (Fig. 4E) yet less clearly aligned with its inter-temperature counterpart.

In order to represent data from various temperatures within the same low-dimensional space, we performed a

PCA analysis on the pooled covariance matrix, combining all intra-temperature arrays after standardization (Fig. 4C, E, solid gray line). Based on the Guttman-Kaiser criterion, we only retained the first two principal components [28] (Additional file 1: Figure S1D). Figure 4F shows the entire dataset projected in this unique 2D PCA space, where the temperature is color-coded. As the temperature is increased, the accessible locomotor space is shifted towards higher values of both marginal projections, with a concurrent widening of the distribution for the first PC. These observations are thus in line with the view that the trajectories are confined to a manifold defined by the correlation between the various parameters. Each temperature delimits a specific accessible region of this subspace as defined by the PCs projection values.

Single-fish recordings reveal a slow diffusive-like modulation of the locomotor behavior

The experiments on which these analysis were performed are based on simultaneous recordings of 10 fish for each batch. As we cannot track individual fish over the entire session, we cannot evaluate to what extent individual animals' navigational pattern may vary during the course of the assay. To address this specific question, we performed a second series of experiments in which single animals ($N = 18$) were continuously monitored for 2h at an intermediate bath temperature of 26 °C. The same analysis pipeline was implemented. In particular, the recordings were split into successive "trajectories" corresponding to wall-to-wall sequences. We observed that over the course of the assay, the trajectories tended to exhibit strongly distinct features as illustrated in Fig. 5A, reflecting a significant intra-individual behavioral variability.

For each individual, we similarly computed a feature matrix containing, for all successive trajectories, the mean interbout interval, reorientation angle of turn events, displacement, turning probability, and flipping rate. We then performed a PCA on each array. Both the explained variance (Additional file 2: Figure S2A) and the PCA coefficients (Fig. 5B, C) were unchanged with respect to the multi-fish analysis (5B, C, gray line). This indicates that the covariance structure in the locomotion pattern is similar at the intra and inter-individual level.

We thus used the multi-fish PC space defined in the preceding section to represent the single-fish data. The result for an example fish is shown in Fig. 5D where the successive trajectories are indicated as dots in this two-dimensional PC space. This representation reveals a slow diffusive-like exploration of the locomotor space over the course of the experiment, with a progressive transition from one type of trajectory (e.g., long displacements, frequent bouts, frequent turns) to another (e.g., short displacements, longer interbout intervals, and fewer turns).

To quantify the time-scale of this itinerant exploration within the locomotor space, we computed the autocorrelation function (ACF) of the projections on the two first PCA components (5E, F, black line). These curves could be captured by an Ornstein–Uhlenbeck (O.U.) process, which describes the dynamics of a random walker within a quadratic energy basin [29, 30], see "Methods" section). The latter allows one to bound the stochastic exploration within a finite region of the locomotor space. From the fit, we extracted the times needed for the dynamical system to reach its stationary regime: $\tau = 2585 \pm 58$ s for PC1, $\tau = 1980 \pm 14$ s for PC2 (mean $\pm$ s.e.m.). These values clearly demonstrate that the modulation of the exploratory behavior in individual animals takes place over time scales that are orders of magnitude longer than the interbout interval.

This series of experiments allowed us to further assess the relative contribution of the intra- and inter-individual components in the observed behavioral variability. As the assay is longer (2 h) than the time needed to reach the stationary regime ($\sim$ 2000 s), each recording provides an estimate of the intra-individual variability. The latter was quantified in the PC space as the variance of the PC projections across the entire duration of the assay, averaged over the various individuals. We then separately computed the variance of the PC projections, pooling the data of all animals (Additional file 2: Figure S2D, green). The latter quantity thus encompasses both inter- and intra-individual variability. This analysis led to the conclusion that a dominant fraction of the variance (68% on PC1, 53% on PC2) can be explained by the intra-individual variability.

Simulations of spontaneous navigation at various temperatures reveal basic thermophobic behavior without direct gradient-sensing mechanism

Having thoroughly characterized the statistical structure of the kinematic parameters and their thermal modulation, we sought to build a minimal stochastic model of the fish navigation in order to generate synthetic trajectories at different temperatures. Each kinematic parameter defines a random variable whose mean is set by the temperature and whose statistical distribution accounts for both the inter-trajectory variability and the per-bout stochasticity. The dual nature of the variability was mathematically recapitulated by expressing each of the 5 kinematic variables as a product of two stochastic, temperature-independent variables: one accounting for the trajectory-to-trajectory modulation (within a range controlled by the bath temperature, Additional file 3: Figure S3B-E, Y column), and the other reflecting the remaining short-term variability (bout-to-bout, Additional file 3: Figure S3B-E, ϵ column, see "Methods" section). For the former, we used the copula method

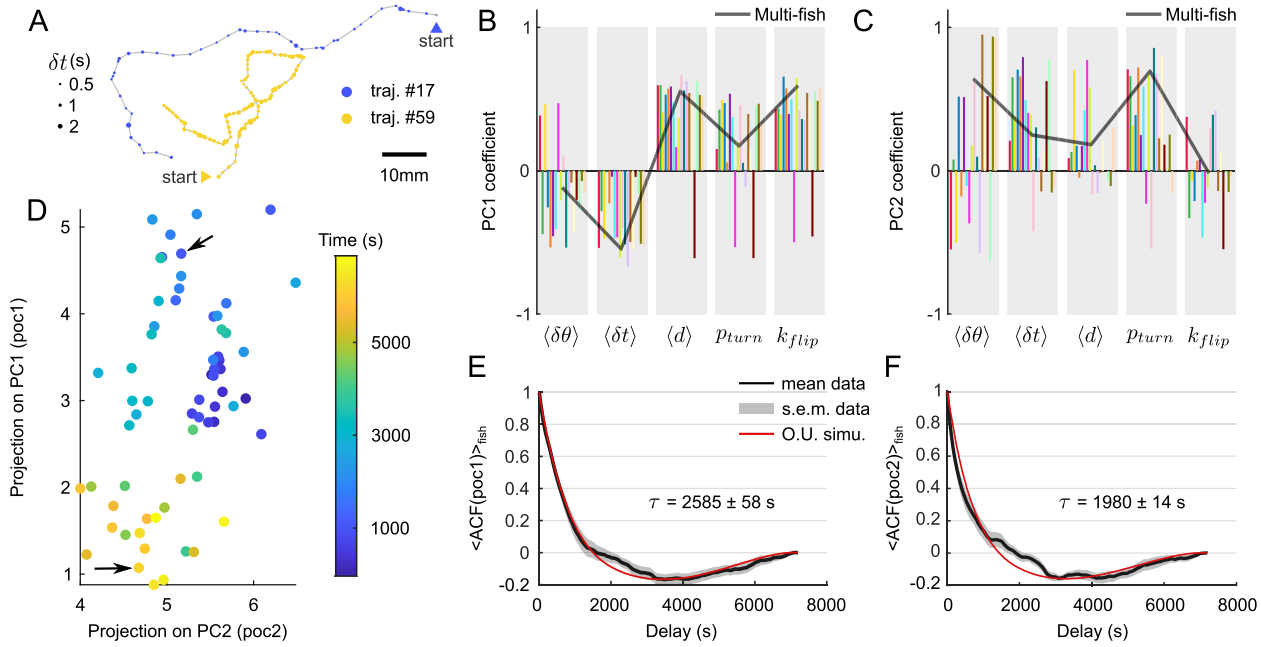


Fig. 5 Diffusive-like exploration of the behavioral manifold for individual fish. **A** Two qualitatively different trajectories from the same fish at the same temperature (26°C), recorded at 1h interval. **B**, **C** Coefficients of the two first principal components for 18 different fish (one color corresponds to one fish). The solid line is the PC coefficients computed from the multi-fish experiments as shown in Fig. 4E and F. **D** Time-evolution of the projections in the 2D PCA space from an example fish. One dot corresponds to one trajectory whose parameters are projected on the multi-fish PC space. Color encodes the time at which the trajectory starts. Arrows show trajectories represented in **A** with the same color. Autocorrelation function of the projections on **E** PC1 and **F** PC2, averaged across fish. Gray area is the standard error of the mean. Red line is the autocorrelation function of a simulated Ornstein–Uhlenbeck process whose bias parameter ($1/\tau$) is fitted to the data

to reproduce the observed covariance of the per-trajectory means of the various parameters.

This approach allowed us to generate various trajectories at different temperatures, as illustrated in Fig. 6A. These trajectories are qualitatively similar to those typically observed at the corresponding temperatures (see Fig. 1C for a comparison). To quantify how this stochastic model captures the exploratory behavior, we computed the mean square displacement (MSD, Fig. 6B) and the mean square reorientation (MSR, Fig. 6C) on both the real (dots) and numerical data (solid lines). Overall, the exploratory dynamics appear to be correctly reproduced by the numerical model. Importantly, the inter-trajectory variability is also, by construction, correctly reproduced by this minimal model.

This model was used to probe how the temperature dependence of the navigational kinematics may participate in driving the animal along thermal gradients. We first experimentally quantified how zebrafish larvae responded to a linear thermal gradient spanning our temperature range (18–33 °C), by focusing on the steady-state occupation distribution. We found that the larvae favor regions where the temperature is comprised between 23 and 29 °C (Additional file 4: Figure S4), i.e., they tend to avoid both extreme (hot and cold) regions. The underlying sensory-motor mechanism is bound to involve both the effect of the temperature on the fish navigation pattern (thermokinesis) and a direct (immediate) response to perceived temperature changes (thermotaxis) [14, 16]. Our model allows us to assess the relative contribution of the kinesis process. In order to do so, we implemented a simulation in which a virtual fish navigates in a rectangular pool ($L \times 45$ mm) in which we imposed a linear thermal gradient along the horizontal x-axis spanning the 18–33 °C range. We simulated trajectories of numerical swimmers by continuously updating their exploratory statistics according to the local bath temperature. These changes are entirely controlled by the temperature-dependence of the 5 kinematic parameters, which we linearly interpolated across the thermal gradient. Four gradient strengths were emulated by changing the length L of the pool ($L = 0.1, 0.3, 0.5, 1$ m).

The time evolution of the position distribution along the gradient are shown as heatmaps in Fig. 6D. They reveal a global drift of the population towards the low temperature region for all values of the thermal gradient (Fig. 6E). In all conditions, the distributions were found to converge towards a unique steady-state profile after a finite time.

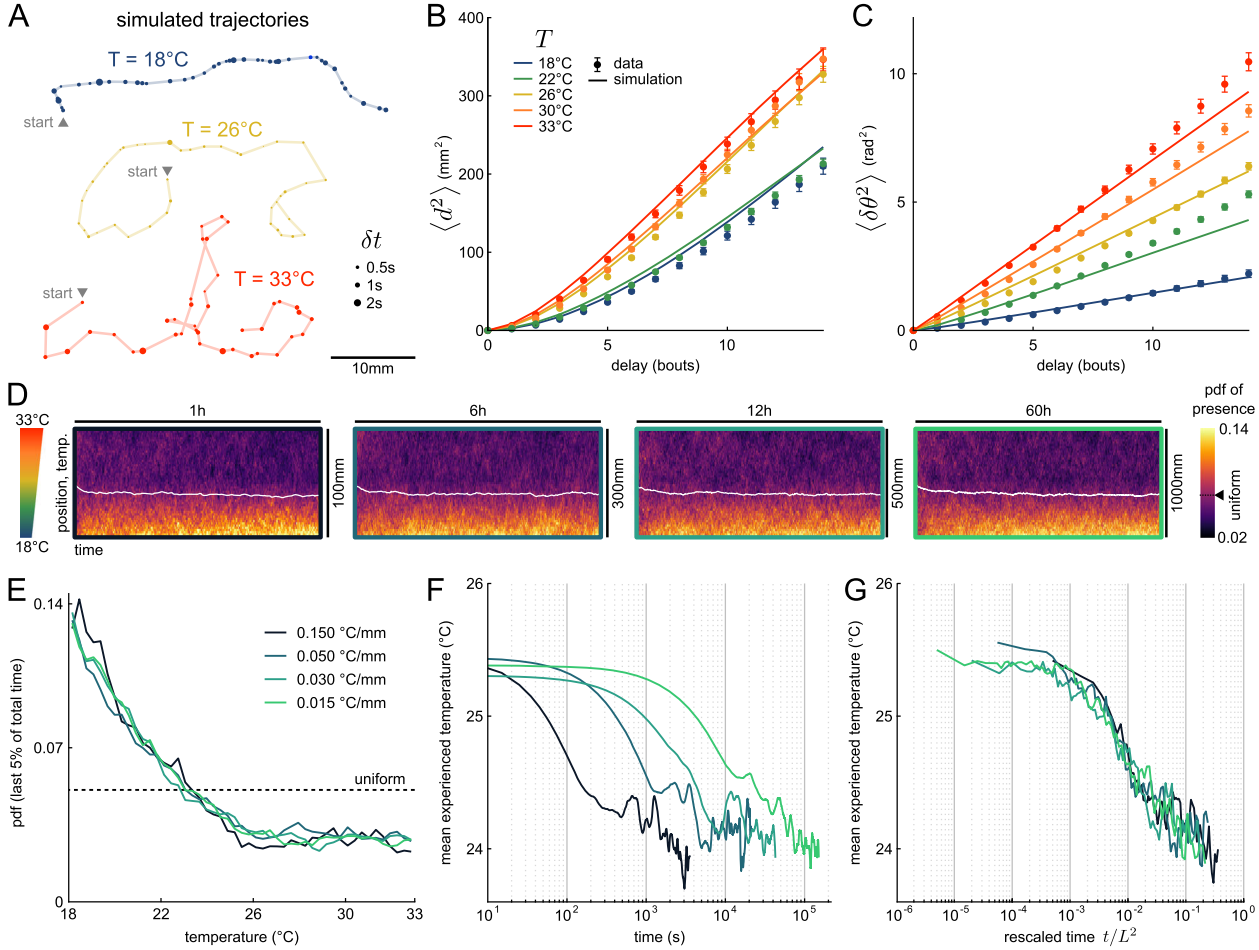


Fig. 6 Simulations indicate that zebrafish does not need gradient information to perform negative thermotaxis. **A** Example trajectories generated with a simulation based on rescaled multivariate distributions (see "Methods" section). **B** Mean square displacement, from data (dots) and simulation (line). **C** Mean square reorientation, from data (dots) and simulation (line). **D** Distributions of presence of simulated fish through time, for four strengths of temperature gradient. The white curve is the average position over time. The expected value for a uniform distribution is highlighted on the colormap. **E** Steady-state distribution of presence as a function of temperature. The dashed line is the expected value for an uniform distribution. **F** Temporal evolution of the average position over time (only the first 75 bins are shown for readability). **G** Distribution mean as a function of the time rescaled by the squared pool length

The probability of presence in the steady-state regime displays a quasi-linear decay from 18 to 26 °C, and remains uniform at higher temperature. The thermokinesis process thus endows the animal with a basic thermophobic behavior, even for minute gradients — orders of magnitude smaller than those imposed in thermotactic assays. In contrast, the avoidance of cold regions seen in experiments (Additional file 4: Figure S4, see "Methods" section) is absent in our simulations and must therefore reflect a direct gradient-sensing mechanism.

The dynamic of this thermophobic behavior in the simulations appears to depend on the imposed gradient, as illustrated in Fig. 6F, which shows the mean experienced temperature across the population as a function of time for the three gradients. All the curves display a similar decay associated with a global drift towards the cold region, until a similar plateau value is reached, albeit with different time-scales. Due to the diffusive nature of the fish spatial exploration, the settling time is expected to scale with the square of the pool length. Consistently, the four dynamic evolution are found to fall on a unique curve when plotted as a function of t/L^2 (Fig. 6G). The associated settling times range from 10 min for the largest gradient up to $\sim$ 14 h for the smallest one.

Discussion

Animal behaviors unfold as trajectories in a high dimensional space of motor actions. To make behavior mathematically tractable, one needs to unveil statistical rules that couple the different components of the behavior and

organize them across time-scales. This dimensionality reduction approach is a pre-requisite to further distinguish between deterministic and stochastic components of the behavior and concurrently discover the underlying neural mechanisms [31, 32]. Leveraging novel techniques for high-throughput behavioral monitoring and automatic classifications has allowed to elucidate the statistical structure organizing self-generated behaviors in numerous species, such as *C. elegans* [33], *Drosophila* [34, 35], zebrafish [21, 36], or mice [37].

With its bout-based navigation, zebrafish larva offers a relatively simple model for such an endeavor. It has been shown that as few as 13 different swim bout types are sufficient to capture the entirety of its behavioral repertoire [21]. Here we focus on spontaneous exploration in the absence of time-varying sensory cues. For this particular behavior, Marques et al. showed that only 4 different bout types effectively contribute to the navigation. In the present work, we further restricted the discretization to only two categories (forward and turn bouts), and extracted 5 kinematic variables, ignoring fine differences in tail bout execution. We showed that the knowledge of these 5 variables statistics nevertheless suffices to fully characterize the long-term exploratory process. Indeed, synthetic trajectories generated by stochastic sampling from the statistical distributions extracted from the data accurately reproduce the experimentally observed angular and translational dynamics.

Using this reductionist approach, we were able to demonstrate that the variability in the fish exploratory dynamics originates from two separate mechanisms, acting on distinct time-scales. Over a few bouts, the fish displacement is akin to a random walk in which multiple stochastic processes set the successive values of two discrete (bout type and turn bout orientation) and three continuous (interbout-interval, linear, and angular displacements) variables that together define its instantaneous in-plane velocity. These processes are statistically constrained by mean transition rates and amplitude probability distributions that can be considered invariant at the scale of individual trajectories (i.e., over tens of bouts). These parameters however vary significantly over long time scales: their time modulation takes place over hundreds to thousands of bouts, indicative of a clear time-separation between the two different processes. Importantly, although we did not observe any significant correlation in the instantaneous locomotor variables, the slow modulation of the kinematic parameters exhibits robust covariance and is thus constrained within a well-defined kinematic manifold.

The present study allowed us to quantify how the water temperature modulates the locomotor statistics of zebrafish larvae. Rather than evoking distinct locomotor patterns, temperature controls the relative occupancy within this subspace: changing the temperature consistently impacts the mean value of the kinematic parameters but leaves their covariance structure unchanged. Temperature thus essentially sets the accessible range of exploratory trajectories within a well-defined continuum of possible locomotor behaviors.

At the circuit level, it is tempting to interpret these observations by considering the brain as a dynamical system exhibiting multiple metastable patterns of activity (brain states) whose relative stability and transition rates define a particular energy landscape [38]. In this view, the short-time dynamics that select the successive bout properties correspond to a stochastic itinerant exploration of this neuronal landscape. The latter is essentially invariant over minutes but is slowly reshaped via endogenous processes or through temperature changes, leading to a gradual modification of the short-term statistics.

Slow modulation of locomotor characteristics in zebrafish larvae have been reported in two recent studies [2, 36]. In [2], the authors identified two discrete states, associated with exploration and exploitation during foraging, with typical persistent times of order of minutes. In [36], progressive changes in locomotor statistics were associated with decaying hunger state, as the initially starved animal progressively reached satiety. In contrast with these two studies, the modulation in locomotor kinematics that we observed is continuous and does not reflect spatial heterogeneities in the environment (e.g., local presence of preys) or explicit changes in internal states such as satiety. With respect to hunger state, the use of temperature may offer a practical way to externally drive the internal state to a stationary point in an ethologically relevant way.

The neuronal basis of this internal state modulation process remains to be elucidated. The circuits regulating specific locomotor features, such as the bout frequency [39] or orientational persistence [25, 26] have been identified. However, the fact that the various kinematic parameters display concerted endogenous modulations points towards a global drive. Temperature is known to impact cellular and synaptic mechanisms [40] in such a way that an increase in temperature tends to speed up neuronal oscillatory processes [41, 42]. This may explain the concurrent decrease in the persistent times associated with the orientational persistence and interbout intervals. The thermal modulation of the angular and linear amplitude of the bouts may in turn reflect a temperature dependence of the muscular efficiency rather than neuronal processes [43]. Another possibility is that the temperature drives the activity level of neuromodulatory centers which may also exhibit slow endogeneous modulations. This neuromodulation release would then globally impact the spontaneous dynamics of various premotor centers yielding the observed change in locomotor patterns. The

serotonergic neurons of the dorsal raphe constitute an attractive candidate for such a mechanism as their activation has been shown in numerous instances to drive a persistent change in behavior in zebrafish [2, 5, 44], as well as in mice [45].

Our study yields a minimal numerical model of zebrafish locomotion at different temperatures. This model allowed us to probe in silico how the thermal modulation of the exploratory dynamics may contribute to the thermotaxis behavior, thus complementing direct gradient-sensing mechanisms [17]. Our simulations indicate that this thermokinesis process endows the animal with the capacity to efficiently avoid hotter regions, but cannot explain the observed avoidance of cold water. As thermal gradient sensing operates within a time window of 400 ms [16], it may be ineffective in conditions where the lengthscale of thermal gradients is much larger than the typical distance traveled per bout. In such conditions, this complementary mechanism may be strategically relevant as it allows the animal to navigate away from potentially noxious regions.

Conclusions

This study establishes the temperature as an effective and practical external parameter to explore behavior variability in vertebrates. Our analysis provides simple latent variables, namely the two first PCA projections, that can be used to efficiently track the animal's behavioral state. Changes in behavioral states are generally induced through complex protocols, involving a perturbation of a sensorimotor loop, or through abrupt changes in sensory conditions [46]. In such approaches, the change is discrete and generally transient as the animal eventually adapts to the new conditions. In contrast, temperature offers a way to drive a robust, continuous, and chronic shift in behavior that can be easily implemented while performing large-scale brain monitoring. Various behavioral states are thought to reflect different levels of attention or arousal, which in turn impact the responses to sensory stimulation. Beyond its utility for studying how a given neuronal circuit may give rise to distinct dynamics, thermal perturbation could also be leveraged to investigate how internal states may enhance or inhibit sensory responses.

Methods

Animals maintenance

Experiments were performed with wild type *Danio rerio* AB, aged 5 to 7 days post-fertilization (dpf). Larvae were reared in Petri dishes containing embryo medium (E3), at 28 °C, with a 14/10-h cycle of light/dark and were fed with nursery powder GM75 everyday from 6dpf. Experiments were done during daytime, in E3. They were approved by Le Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale Charles Darwin C2EA-05 (02601.01).

Experimental setup

The container consists in a rectangular pool ($100 \times 45 \times 2.5$ mm^3) made of copper whose surface was protected by a biocompatible heat-resistant black layer (Rust-Oleum). It is stuck on two 78W Peltier modules (Adaptive) with thermal tape (3M). A transparent, 2-mm-thick PMMA cover is placed over the pool with 2 mm spacers to minimize water evaporation, leaving a water thickness of 4.5 mm. The temperature is measured at both ends of the pool with thermocouples type T (Omega). The two left/right error signals ($T_{\text{target}} - T_{\text{measured}}$) are used within two independent PID loops implemented on an Arduino Uno board (Arduino) whose coefficients have been optimized manually. Each PID regulates the PWM frequency sent to a H-bridge driving the power sent to the two Peltier modules. A graphical user interface (GUI) written in C++ using the Qt framework is used to monitor the measured temperatures and to impose the target temperatures on both ends. Due to its high thermal diffusivity, the copper piece quickly reaches a uniform temperature and acts as a thermostat for the water. After about 4 min, the temperature of the water in the center of the pool has reached the set temperature ($\pm$ 0.2 °C), which then remains constant over time. The GUI monitors the bath temperatures while grabbing frames from a CMOS camera (FLIR Chameleon3 CM3-U3-13Y3M-CS) coupled with a macrolens (Navitar) at 25 frames per second. The whole apparatus is placed in a light-tight box, illuminated with a homogeneous white light emitted by a LED panel (Moritex) placed on the side; a mirror placed at the other side limits significant phototactic bias in the small direction of the pool. All codes mentioned above are available on Github [47] under a GNU GPLv3 license. Blueprints of the box and pool as well as electronic designs are available upon request.

Innocuity of the black-painted copper pool

Zebrafish larvae are sensitive to minute concentration of chemicals. To check the innocuity of the container, ten zebrafish larvae were left overnight inside the setup. All survived and were swimming actively. We further checked whether the black layer may releases chemical compounds that could impact the animals navigational dynamics. We prepared a stock of E3 heated for 1 h at 45 °C in the experimental setup. Three batches of 10 larvae were then sequentially recorded for 30 min in E3 (control), in a Petri dish, then placed for 40 min in the heated E3 and recorded again for 30 min (treated). Both experiments were performed at 28 °C. We then computed the mean interbout interval, mean displacement, mean reorientation amplitude for each batch, and the cumulative mean square displacement. Additional file 5: Figure S5A shows that none of these quantities display any significant change for larvae recorded in the heated water with respect to the

control. Copper being known to alter lateral line neuromasts [48], we further tested the absence of copper ions by incubating 10 larvae in the heated E3 for 2 h before marking their lateral line neuromasts with DiAsp according to the protocol detailed in [48]. All larvae displayed intact lateral line neuromasts.

Experimental protocols

The pool is filled with E3. A temperature is randomly drawn from 18, 22, 26, 30, 33 °C and set with the GUI. After 10 min, a batch of 10 zebrafish larvae is introduced in the pool. After 10 min of habituation, the fish kinematics are monitored for 1800 s (half an hour). In order to confirm the full habituation of the animal to the new conditions, we checked that the fish navigation is indeed time-invariant during the recording period. We evenly split each recording into 3 time windows and computed the statistics of the various kinematic parameters (mean bout frequency, displacement, and reorientation amplitude) for these 3 periods, The distributions within each time-window are not significantly different ($p > 0.1$, two-sample Kolmogorov-Smirnov test) as shown in Additional file 5: Figure S5B. Fish remain in the pool while we randomly draw a new non-tested temperature. After 20 min (temperature regulation and habituation), a new recording of 1800 s is performed. The five temperatures are not systematically tested on all batches, but for each temperature, 10 different batches of 10 fish are used. To check whether the testing order may impact the kinematic of swimming for a given temperature, we separated the assays in two groups depending on whether the previous recording was performed at a lower ($\Delta T > 0$) versus higher ($\Delta T < 0$) temperature. We then computed the mean interbout intervals, mean displacement and mean reorientation amplitude normalized by their temperature mean. The comparison of the two distributions is shown in Additional file 5: Figure S5C. For all parameters, the statistical difference is non-significant, indicating that the testing order has no major impact on the navigational statistics. In total, the experiments involved 17 different batches. The sample size was not statistically determined beforehand.

For single-fish experiments, the same protocol is used except that a single fish was placed in the pool. The recordings last for 2 h and only $T = 26$ °C is tested.

For thermal gradient experiments (Additional file 4: Figure S4), 10 larvae are used during 45 min. The first 5 min are recorded with a uniform temperature of 22°C, then a linear gradient is imposed during 40 min, from 18 to 33 °C. The gradient direction (i.e., which side is set to either 18 or 33 °C) is chosen randomly. 10 different batches are tested. The distribution of presence along the gradient is computed over the last 2 min (5% of the gradient duration) such as to allow enough time for the animals to reach a steady-state.

Tracking and basic analysis

Larvae were tracked offline using the open-source FastTrack software [22]. It generates a text file containing the position of each fish's center of mass and body angle across frames until they leave the defined ROI. Kinematic analyses were performed using MATLAB (R2020a, Mathworks). Bouts are detected when the instantaneous speed is greater than two times the overall variance of the speed. Putative bouts are then filtered on a distance criterion (bouts with a linear displacement — measured in a time window of $\pm$ 0.5 s centered on the bout onset — less than 0.3 mm or greater than 18 mm are rejected) and on a temporal criterion (bouts occurring within 0.4 s after a bout are rejected). Bout timing is defined as 80 ms before the velocity peak. Detection performance was checked manually on randomly selected sequences. From positions, time, and body angles before and after a bout event, we computed displacements, interbout intervals, and turn angles associated with each bout. Data are split into trajectories, from one edge of the ROI (set at 5 mm from the walls) to another. Only trajectories that last at least 25 s, with at least 10 bouts, with 3 bout types (left turn, right turn, and forward scoot) are kept for further analysis. Trajectories last on average 67 s (median 47 s, 95th percentile 178 s) and contain on average 60 bouts (median 44 bouts, 95th percentile 154 bouts). The number of trajectories and the number of bouts retained for further analysis are given for each temperature in Table 1. The effect of the chosen cutoffs (minimum trajectory duration and minimum interbout interval) used for trajectory and bout selection is tested in Additional file 6: Figure S6. This control demonstrates that changing these cutoffs has no significant impact on our results. All MATLAB routines are available on Gitlab [49] under the GNU GPLv3 license.

Table 1 Number of trajectories, number of bouts, and mean trajectory duration kept for analysis per temperature

	Temperature (°C)				
	18	**22**	**26**	**30**	**33**
# traj.	617	1405	1533	1308	1079
# bouts	34931	96365	89955	77203	48836
Duration (s)	100	82	56	60	50

Bout classification

To discriminate whether a bout falls in the forward or the turning categories, we fitted the one-sided (absolute value) reorientation angles distributions with the sum of a zero-mean Gaussian distribution and a gamma distribution. The Gaussian corresponds to the part of the distribution close to zero, while the gamma function aims at describing the distribution of high angle reorientations. We manually set the Gaussian width and the scale parameter of the gamma function based on the observed distributions. We fitted the shape parameter for each temperature, ensuring that the slope at high angles in logarithmic scale is well reproduced. Then, we defined a fixed threshold for the angles to be considered as a turn or a forward bout. This threshold is the angle at which the two distributions cross, invariably found around 10° ($10.25 \pm 0.23°$, mean $\pm$ sd). This value of 10° (0.17 rad) was used to classify bouts throughout this work.

Displacement correction

We noticed that the displacement corresponding to a turn event was systematically larger than the displacement associated to a forward event. This is due to the fine structure of a turning bout: first, the fish performs a small reorienting bout, then it scoots forward [20]. Since we do not look at this fine structure, the overall displacement during a turn bout is geometrically overestimated and would bias temperature-to-temperature comparison. We computed the ratio between displacements during turns and the ones during forward swims, and found a factor of 1.6 ± 0.1, regardless of the temperature. Therefore, in all analyses presented in this work, all displacements corresponding to a turn event were corrected by a factor $1/1.6 = 0.625$.

Statistical methods

Probability density functions (pdf) were computed with a kernel density estimation through the built-in Matlab function `ksdensity`, with a bandwidth of 0.1 for interbout intervals and displacements and 0.5 for turn angles. For the distributions of Fig. 2, a pdf was computed for each batch and the mean and standard error of the mean are computed. For rescaled curves (Additional file 3: Figure S3), data from all experiments were pooled to compute the temperature-average quantity $\overline{X}_T$ and rescaled values. Boxplots were made with the built-in Matlab function `boxchart`, using as input data the means of the respective quantities for trial (one dot corresponds to a batch of 10 fish). For simulations of navigation, averages over temperature were computed by pooling all bout events from all experiments corresponding to this particular temperature. p_{turn} and p_{flip} values were estimated for each trajectory and then averaged. Error bars for those temperature averages and for the pdf shown in Additional file 3: Figure S3 were all computed using bootstrapping with 1000 boots to get the 95% confidence interval through the built-in `bootci` function. Errors were propagated for the ratio of p_{flip} and $\langle \delta t \rangle_T$ in Fig. 3F.

Reorientation dynamics

The two Markov chains model has been described in details in a previous study [18]. We first binned the reorientation angles $\delta\theta$ into a ternarized reorientation Δ, with values -1 (right turn R), 0 (forward bout F) and $+1$ (left turn L). To extract p_{flip}, we analytically derived the mean reorientation Δ_{n+1} given the previous reorientation Δ_n. There are 9 combinations of bouts $\{n; n+1\}$: $\{L;L\}, \{L;R\}, \{L;F\}, \{F;L\}, \{F;R\}, \{F;F\}, \{R;L\}, \{R;R\}, \{R;F\}$. All combinations involving a forward bout yield 0. Remain combinations with two turns in the same direction and two turns in the opposite direction. For a turn in direction L (resp. R), the associated probability corresponds to the case where a flip occurred (i.e., the previous bout was in direction R, resp. L) and the case where no flip occurred (i.e., the previous bout was in direction L, resp. R). Noting Δ_n^R and Δ_n^L the turns in the right and left direction at bout n, the mean reorientation given the direction of the previous bout reads:

$$\langle \Delta_{n+1} \rangle_{\Delta_n^L} = p_{turn} \left(p_{flip} \Delta_n^R + (1 - p_{flip}) \Delta_n^L \right)$$

$$\langle \Delta_{n+1} \rangle_{\Delta_n^R} = p_{turn} \left(p_{flip} \Delta_n^L + (1 - p_{flip}) \Delta_n^R \right)$$

These equations can be summed up as:

$$\langle \Delta_{n+1} \rangle_{\Delta_n} = p_{turn} \left(1 - 2 p_{flip} \right) \Delta_n \tag{1}$$

This is the fit used in Fig. 3B.

A random telegraph signal is a binary stochastic process with constant transition probability per unit of time. In the case where both states are equiprobable, the two transition rates (here noted k_{flip}) are equal. For such processes, the time spent in one or the other state (left or right) is exponentially distributed [27] and the autocorrelation function for a zero-mean signal reads :

$$R_{\Delta\Delta}(t) = e^{-2 k_{flip} t} \tag{2}$$

This is the fit used in Fig. 3E.

Mean square displacement (MSD) $\langle d^2 \rangle$ and mean square reorientation (MSR) $\langle \delta\theta^2 \rangle$ were computed using the MATLAB package `msdanalyzer` [50]. All (x, y) and $\delta\theta$ sequences are pooled by temperature for both data and simulations, the MSD and MSR were computed for each sequence and we show in Fig. 6B and C the ensemble average for each temperature with the standard error of the mean.

Principal components analysis

The "features matrices" were built for each temperature. They include, for each trajectory, mean interbout intervals, turn probability, flip rate (estimated as $p_{flip}/\langle \delta t \rangle$,

p_{flip} being extracted as explained above, for each trajectory), mean reorientation angle of turning events and mean displacements. Each set was standardized (centered and normalized by its standard deviation) before being processed by the single value decomposition (SVD) algorithm through the built-in `pca` function. Those 5 intra-temperature standardized arrays are then concatenated to form the so-called pooled matrix, that is in turn used to find a common space through PCA. For projection, each set was normalized by the standard deviation of all the pooled data (regardless of temperature) and not centered for comparison purposes. The aforementioned common space was also used to project data from single-fish experiments.

Numerical Ornstein-Uhlenbeck process

The single-fish experiments contains an average of 48 ± 16 trajectories (mean $\pm$ sd) with a median duration of 42 s and a value of the 90th percentile of 122 s. Each trajectory yields one point in the PC space. We then linearly interpolated the PCA projection values in order to produce a discrete signal defined over the same time vector across the total duration of the assay (7200 s), sampled every second. For each fish, on both PC, we computed the autocorrelation function (Additional file 2: Figure S2B-C) before averaging them (Fig. 5E, F, black line is the mean, shade is the s.e.m.). The autocorrelation function of a OU process reads [30]:

$$\langle X(t)X(s)\rangle_s = \frac{D}{2k}\exp\left(-k|t-s|\right)$$

where D is the diffusion coefficient and k is the bias term. However, this expression is only valid in the limit where the recording time is much larger than the relaxation time $1/k$ of the process. When the recording duration is of order of the autocorrelation decay time, the computed autocorrelation function exhibits a negative overshoot, which reflects an incorrect estimate of the long-time mean of the signal. This issue is common to stochastic signals whose mean is unknown. In order to fit the experimental autocorrelation and extract the relaxation time $\tau = 1/k$, we used simulated dynamics over similar time-windows. Numerical simulations of the Ornstein–Uhlenbeck (O.U.) process were sequentially implemented using the following equation [51] :

$$X_{i+1} = X_i + \sqrt{2D}\mathcal{N}_i\sqrt{\delta t} - kX_i\delta t$$

with δt the time interval chosen for the simulation (units s) and $\mathcal{N}$ is a random number drawn from a normal distribution.

To determine τ, we generated 500 realizations of the O.U. process with D set to 1 and τ set to values in a given range. For each realization, we computed the autocorrelation function (ACF) and averaged them across realizations. We then computed the residual sum of square (RSS) and chose the minimum one to select the best parameter τ. After manually narrowing down the best range for τ (PC1, 2000 to 3000 s, 1000 values; PC2, 1900 to 2100 s, 1000 values), we repeated the previous process 20 times to get 20 "best τ" and we report the mean $\pm$ s.e.m. in the text and figure.

It should be noticed that the autocorrelation decay times extracted from this analysis are 2585 and 1980 s, for PC1 and PC2 respectively. These time-scales are thus one order of magnitude larger than the typical trajectory duration. This clear time-scale separation a posteriori validates the per-trajectory discretization used in our analysis.

Numerical simulations of trajectories

Trajectories were simulated using the framework described in Additional file 3: Figure S3, based on the hypothesis that (1) spatio-temporal dynamics can be reproduced solely from five parameters, (2) per-bout values of interbout intervals (δt), displacements (d) and turn angles ($\delta\theta$) are drawn from a distribution that can be decomposed as $X = \overline{X}_T Y\epsilon$, (3) the per-trajectory values of turning probability (p_{turn}) and flipping probability (p_{flip}) are drawn from a distribution that can be decomposed as $X = \overline{X}_T Y$, and (4) the trajectory-averaged parameters are correlated. Note that for the simulations we use p_{flip} rather than flipping rate for simplicity in the code implementation.

$\overline{X}_T$, the temperature average

All per-bout values of δt, d, reorientation angle of turn events ($\delta\theta_t$) and reorientation angles of forward events ($\delta\theta_f$) are pooled by temperature and the mean is computed. A p_{turn} and a p_{flip} is estimated for each trajectory, pooled by temperature and averaged (Additional file 3: Figure S3B-E, left column).

Y, the trajectory means variability

For each trajectory, a mean value is computed for δt, d and $\delta\theta_{t/f}$ while p_{turn} and p_{flip} are extracted. They are then rescaled by the corresponding temperature average value computed above. For each temperature, a cumulative density function (cdf) is computed. They are then averaged across temperatures to get a single Y cdf for each parameters (pdf shown in Additional file 3: Figure S3B-E, middle column).

ϵ, the per-bout variability

Similarly, for each trajectory we rescale values of δt, d and $\delta\theta_{t/f}$ by their corresponding trajectory mean. Then, all events are pooled by temperature and a cdf is computed. Finally, we will use the mean cdf, resulting in a single ϵ cdf for per-bout parameters. p_{turn} and p_{flip} are defined for a

trajectory, hence they do not have bout-to-bout variability (pdf shown in Additional file 3: Figure S3B-D, right column).

Correlations of means

We compute the Pearson's correlation matrix of the trajectories' parameters (trajectory means and probabilities), for each temperature. The coefficients are then averaged to get a single correlations matrix $\langle R_{traj} \rangle_T$.

Algorithm

After choosing a number n of fish (trajectories), we generate multivariate distributions (copulas) with the MATLAB built-in `mvnrnd` function, with the mean $\langle R_{traj} \rangle_T$ correlations matrix as input. It produces 5 marginal sets of n Gaussian random numbers, correlated with one another. We then get the corresponding normal cdf, which is in turn used to sample the corresponding Y cdfs, inversing the latter. Finally, those samples are multiplied by the corresponding temperature average $\overline{X}_T$. A bout is generated by sampling a displacement and a turning angle, along with a interbout interval during which the virtual fish stands still, from the generic cdf of ϵ. Those values are multiplied by the trajectory means drawn earlier, and the new position (x, y) is computed. The next bout is generated, and so on. For the gradient simulations, the same strategy is used, at the notable difference that the temperature averages are determined dynamically given the position of the agent along the temperature gradient. We used reflective boundary conditions. We checked the consistency between parameters distributions from the data and from the simulations, as well as correlations between trajectory means.

Abbreviations

IBI : Interbout interval

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12915-021-01126-w.

Additional file 1: Figure S1: Correlations between parameters. **A** Pearson's correlation coefficients between per-bout parameters, reorientation angles of turn bouts, interbout interval and displacement. **B** Pearson's correlation matrix between temperature-averaged parameters. **C** Variance explained by the principal components of the inter-temperature matrix. **D** Eigenvalues of the pooled intra-temperature matrix. The red line highlights the Kaiser-Guttman criterion.

Additional file 2: Figure S2: PCA in single-fish experiments. **A** Variance explained by the five principal components for each single-fish. **B**-**C** Autocorrelation function of the projection on PC1 (B) and PC2 (C) from each fish in single-fish experiments. The color code is the same as in A, black line and shaded area is the mean and s.e.m. across fish. **D** Mean variance of projections across time (intra, purple) and overall variance of projections (green). Error bars for intra is the s.e.m. and error bars for overall is 95confidence intervals after bootstrapping (n=1000 boots).

Additional file 3: Figure S3: Temperature-independant rescaling of parameters. **A** Equation describing parameter X distribution. **B**-**E** Left to right, temperature-averaged value, trajectory-averaged rescaled by temperature averaged-value and per-bout value rescaled by the trajectory average, for **B** interbout intervals, **C** displacements, **D** reorientation angle of turn events, **E** turning probability.

Additional file 4: Figure S4: Fish position distributions along a linear thermal gradient. Presence probability density function of 10 batches of 10 larvae experiencing a thermal gradient from 18°C to 33°C. Solid line is the mean across batches, shaded area is the s.e.m. Dashed line is the expected value for a uniform distribution.

Additional file 5: Figure S5: Controls. **A** Example statistics of three batches successively recorded in E3 (control) and in E3 previously heated at 45°C for one hour in the experimental setup. (Left to right, up to bottom) Mean interbout interval, mean displacement, amplitude of turn bouts reorientation angle and mean square reorientation. **B** Example statistics from all experiments pooled together, dividing time into three windows of 10 min. (Left to right, up to bottom) Mean interbout interval, mean displacement, amplitude of turn bouts reorientation angle. **C** Example statistics at a given temperature (current T) as a function of the previously tested temperature. One dot is the mean parameter value for one experiment, color encoded current temperatures, lines are the mean for each previous temperature. (Left to right, up to bottom) Mean interbout interval, mean displacement, amplitude of turn bouts reorientation angle.

Additional file 6: Figure S6: Effect of cut-offs in trajectory selection. **A**-**B** Example statistics when changing cutoffs in trajectory selection. (Left to right, up to bottom) Mean interbout interval, mean displacement, fraction of turns, amplitude of turn bouts reorientation angle, first principal component coefficients, second principal component coefficients. **A** With a minimum time between two consecutive bout of 200ms, trajectory must last at least 25 s. **B** With a minimum time between two consecutive bout of 400ms, trajectory must last at least 5 s.

Acknowledgements

We thank the IBPS fish facility staff for the fish maintenance, in particular Stéphane Tronche and Alex Bois. We are grateful to Carounagarane Dore for his contribution to the design of the experimental setup, Geoffrey Migault for engineering expertise, and Raphaël Voituriez for fruitful discussion on the modeling aspects.

Authors' contributions

G.L.G., V.B., R.C., and G.D. conceived the project. R.C. designed the setup. G.L.G. and J.L. performed the experiments. G.L.G., S.K., and G.D. analyzed the data. All authors contributed to the manuscript. The authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was funded by the CNRS, Sorbonne Université, and the Systems Biology Network of Sorbonne Université and supported in part by the Human Frontier Science Program under grant no. RGP0060/2017, by the French Research National Agency under grant no. ANR-16-CE16-0017 and the European Research Council under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program grant agreement no. 715980. Funding bodies did not have any role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data nor in writing the manuscript.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in the Dryad repository https://doi.org/10.5061/dryad.3r2280ggw.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details
[1]Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Laboratoire Jean Perrin (LJP), Paris, France. [2]Université Paris Sciences et Lettres, Paris, France. [3]Present address : Department of Collective Behavior, Max Planck Institute of Animal Behavior, Konstanz, Germany.

Received: 11 May 2021 Accepted: 18 August 2021
Published online: 21 September 2021

References

1. Shaw AK. Causes and consequences of individual variation in animal movement. Mov Ecol. 2020;8(1):12.
2. Marques JC, Li M, Schaak D, Robson DN, Li JM. Internal state dynamics shape brainwide activity and foraging behaviour. Nature. 2020;577(7789):239–43.
3. Gillespie JH. Natural selection for whithin-generation variance in offspring number. Genetics. 1974;76(3):601–6.
4. Philippi T, Seger J. Hedging one's evolutionary bets, revisited. Trends Ecol Evol. 1989;4(2):41–44.
5. Lovett-Barron M, Andalman AS, Allen WE, Vesuna S, Kauvar I, Burns VM, Deisseroth K. Ancestral circuits for the coordinated modulation of brain state. Cell. 2017;171(6):1411–142317.
6. McCormick DA, Nestvogel DB, He BJ. Neuromodulation of brain state and behavior. Ann Rev Neurosci. 2020;43(1):391–415.
7. MacDonald SWS, Nyberg L, Bäckman L. Intra-individual variability in behavior: links to brain structure, neurotransmission and neuronal activity. Trends Neurosci. 2006;29(8):474–80.
8. Hiesinger PR, Hassan BA. The evolution of variability and robustness in neural development. Trends Neurosci. 2018;41(9):577–86.
9. Panier T, Romano SA, Olive R, Pietri T, Sumbre G, Candelier R, Debrégeas G. Fast functional imaging of multiple brain regions in intact zebrafish larvae using selective plane illumination microscopy. Front Neural Circ. 2013;7:65.
10. Ahrens MB, Orger MB, Robson DN, Li JM, Keller PJ. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. Nat Methods. 2013;10(5):413–20.
11. Portugues R, Feierstein CE, Engert F, Orger MB. Whole-brain activity maps reveal stereotyped, distributed networks for visuomotor behavior. Neuron. 2014;81(6):1328–43.
12. Burgess HA, Granato M. Sensorimotor gating in larval zebrafish. J Neurosci. 2007;27(18):4984–94.
13. Burgess HA, Granato M. Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. J Exp Biol. 2007;210(14):2526–39. Chap. Research Article.
14. Haesemeyer M. Thermoregulation in fish. Mol Cell Endocrinol. 2020;518:110986.
15. Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from The Field. Zebrafish. 2007;4(1):21–40.
16. Haesemeyer M, Robson DN, Li JM, Schier AF, Engert F. The structure and timescales of heat perception in larval zebrafish. Cell Systems. 2015;1(5):338–48.
17. Haesemeyer M, Robson DN, Li JM, Schier AF, Engert F. A brain-wide circuit model of heat-evoked swimming behavior in larval zebrafish. Neuron. 2018;98(4):817–8316.
18. Karpenko S, Wolf S, Lafaye J, Le Goc G, Panier T, Bormuth V, Candelier R, Debrégeas G. From behavior to circuit modeling of light-seeking navigation in zebrafish larvae. eLife. 2020;9:52882.
19. Gau P, Poon J, Ufret-Vincenty C, Snelson CD, Gordon SE, Raible DW, Dhaka A. The zebrafish ortholog of TRPV1 is required for heat-induced locomotion. J Neurosci. 2013;33(12):5249–60.
20. Budick SA, O'Malley DM. Locomotor repertoire of the larval zebrafish: swimming, turning and prey capture. J Exp Biol. 2000;203(17):2565–79.
21. Marques JC, Lackner S, Félix R, Orger MB. Structure of the zebrafish locomotor repertoire revealed with unsupervised behavioral clustering. Curr Biol. 2018;28(2):181–1955.
22. Gallois B, Candelier R. FastTrack: an open-source software for tracking varying numbers of deformable objects. PLOS Comput Biol. 2021;17(2):1008697.
23. Schnörr SJ, Steenbergen PJ, Richardson MK, Champagne DL. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. Behav Brain Res. 2012;228(2):367–74.
24. Chen X, Engert F. Navigational strategies underlying phototaxis in larval zebrafish. Front Syst Neurosci. 2014;8:39.
25. Dunn TW, Mu Y, Narayan S, Randlett O, Naumann EA, Yang C-T, Schier AF, Freeman J, Engert F, Ahrens MB. Brain-wide mapping of neural activity controlling zebrafish exploratory locomotion. eLife. 2016;5:12741.
26. Wolf S, Dubreuil AM, Bertoni T, Böhm UL, Bormuth V, Candelier R, Karpenko S, Hildebrand DGC, Bianco IH, Monasson R, Debrégeas G. Sensorimotor computation underlying phototaxis in zebrafish. Nat Commun. 2017;8(1):651.
27. Balakrishnan V. Mathematical physics: applications and problems. Cham: Springer International Publishing; 2020.
28. Kaiser HF. The application of electronic computers to factor analysis. Educ Psychol Meas. 1960;20(1):141–51.
29. Uhlenbeck GE, Ornstein LS. On the theory of the Brownian motion. Physical Review. 1930;36(5):823–41.
30. Gardiner CW. Handbook of stochastic methods: for physics, chemistry and the natural sciences, Study ed., 2. ed., 6. print edn. Berlin: Springer; 2002.
31. Krakauer JW, Ghazanfar AA, Gomez-Marin A, MacIver MA, Poeppel D. Neuroscience needs behavior: correcting a reductionist bias. Neuron. 2017;93(3):480–90.
32. Datta SR, Anderson DJ, Branson K, Perona P, Leifer A. Computational neuroethology: a call to action. Neuron. 2019;104(1):11–24.
33. Stephens GJ, Johnson-Kerner B, Bialek W, Ryu WS. Dimensionality and dynamics in the behavior of *C. elegans*. PLoS Comput Biol. 2008;4(4):1000028.
34. Branson K, Robie AA, Bender J, Perona P, Dickinson MH. High-throughput ethomics in large groups of drosophila. Nat Methods. 2009;6(6):451–7.
35. Mueller JM, Ravbar P, Simpson JH, Carlson JM. Drosophila melanogaster grooming possesses syntax with distinct rules at different temporal scales. PLOS Comput Biol. 2019;15(6):1007105.
36. Johnson RE, Linderman S, Panier T, Wee CL, Song E, Herrera KJ, Miller A, Engert F. Probabilistic models of larval zebrafish behavior reveal structure on many scales. Curr Biol. 2020;30(1):70–824.
37. Wiltschko AB, Johnson MJ, Iurilli G, Peterson RE, Katon JM, Pashkovski SL, Abraira VE, Adams RP, Datta SR. Mapping sub-second structure in mouse behavior. Neuron. 2015;88(6):1121–35.
38. Mazzucato L, Fontanini A, La Camera G. Dynamics of multistable states during ongoing and evoked cortical activity. J Neurosci. 2015;35(21):8214–31.
39. Severi KE, Portugues R, Marques JC, O'Malley DM, Orger MB, Engert F. Neural control and modulation of swimming speed in the larval zebrafish. Neuron. 2014;83(3):692–707.
40. Hille B. Ion channels of excitable membranes, 3rd edn: Sinauer Associates; 2001.
41. Tang LS, Taylor AL, Rinberg A, Marder E. Robustness of a rhythmic circuit to short- and long-term temperature changes. J Neurosci. 2012;32(29):10075–85. Chap. Articles.
42. Rinberg A, Taylor AL, Marder E. The effects of temperature on the stability of a neuronal oscillator. PLOS Comput Biol. 2013;9(1):1002857.
43. Batty RS, Blaxter JHS. The effect of temperature on the burst swimming performance of fish larvae. J Exp Biol. 1992;170(1):187–201. Chap. Journal Articles.
44. Yokogawa T, Hannan MC, Burgess HA. The dorsal raphe modulates sensory responsiveness during arousal in zebrafish. J Neurosci. 2012;32(43):15205–15.
45. Lottem E, Banerjee D, Vertechi P, Sarra D, oude Lohuis M, Mainen ZF. Activation of serotonin neurons promotes active persistence in a probabilistic foraging task. Nat Commun. 2018;9(1):1000.
46. Andalman AS, Burns VM, Lovett-Barron M, Broxton M, Poole B, Yang SJ, Grosenick L, Lerner TN, Chen R, Benster T, Mourrain P, Levoy M, Rajan K, Deisseroth K. Neuronal dynamics regulating brain and behavioral state transitions. Cell. 2019;177(4):970–98520.
47. Candelier R, Le Goc G. ThermoMaster. Github. bfb329d. https://github.com/LJPZebra/ThermoMaster.
48. Hernández PP, Moreno V, Olivari FA, Allende ML. Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (Danio rerio). Hear Res. 2006;213(1-2):1–10.
49. Le Goc G. ThermoMaster Lab. Gitlab12407048. https://gitlab.com/GuillaumeLeGoc/thermomasterlab/.

50. Tarantino N, Tinevez J-Y, Crowell EF, Boisson B, Henriques R, Mhlanga M, Agou F, Israël A, Laplantine E. TNF and IL-1 exhibit distinct ubiquitin requirements for inducing NEMO–IKK supramolecular structures. J Cell Biol. 2014;204(2):231–45.
51. Gillespie DT. Exact numerical simulation of the Ornstein-Uhlenbeck process and its integral. Phys Rev E. 1996;54(2):2084–91.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



III.1.3 Discussion

Dans cette section, on a présenté une étude quantitative de l'effet de la température sur la locomotion de la larve de poisson-zèbre. Spécifiquement, on a montré qu'un jeu minimal de 5 paramètres permet de reproduire la dynamique exploratoire de l'animal et que la température du bassin module ces 5 paramètres. On a pu voir que ces paramètres sont statistiquement couplés et peuvent être décrit par deux composantes principales qui forment l'espace comportemental accessible à l'individu. La variabilité observée au sein d'un même animal est due à un déplacement au sein de cet espace, sur des temps de l'ordre de la demi-heure. La température se révèle être un moyen simple et pratique pour contrôler dans une certaine mesure les états comportementaux de l'animal, qui fait souvent appel à des protocoles plus complexes [109]. De plus, la modulation des paramètres cinématiques dote le poisson d'une capacité à éviter les régions à hautes températures en l'absence d'information sur le gradient de température, ce qui peut s'avérer utile dans un contexte naturel où les gradients peuvent être un ordre de grandeur plus petit que celui ressenti par l'animal lors d'un mouvement.

Dans cette étude, un maximum de deux heures de comportement en nage libre a été enregistré, ce qui ne représente que quatre fois la constante de temps identifiée. Il serait intéressant de suivre ces états sur de plus longues périodes, mais dans ce cas, on se heurterait au problème de faim [112, 113, 114] qui apparaît justement après deux heures chez la larve [115], qui biaiserait inévitablement l'état interne de l'animal. Des composés chimiques qui semblent réduire la faim [116] pourraient être une piste pour pallier à ce problème. Les modèles probabilistes développés par Johnson *et. al.* dans [114] proposent également un cadre d'étude permettant de décrire et prédire le comportement de larves en nage libre dans un contexte de faim et de chasse dans un espace virtuellement infini, qui peut être utilisé pour caractériser un individu. Cette caractérisation de l'état interne individuel, de la même façon que les projections des paramètres dans l'espace comportemental présentées précédemment, permet de quantifier la variabilité intra-individuelle mais aussi de faire la lumière sur la variabilité inter-individuelle. Partant de là, on pourrait alors soumettre l'individu à des stimulations (lumineuses, thermiques, ...), potentiellement couplé à de l'imagerie fonctionnelle, et étudier en détail la variabilité d'un essai à l'autre au sein du même individu et la variabilité des réponses d'un individu à l'autre en fonction l'état interne propre à chacun, déterminé en amont.

L'effet de la température sans variation temporelle sur l'activité neuronale spontanée, nécessairement responsable des modulations observées en comportement, n'a jamais été caractérisée pour la larve de poisson-zèbre. C'est sur cette dernière question que l'on se penchera dans la prochaine section.

III.2 Activité neuronale spontanée : le cas de l'ARTR

La température affecte l'ensemble des paramètres cinématiques de la locomotion de la larve de poisson-zèbre. Pour déterminer l'origine de ces modulations, c'est à dire comprendre comment l'activité cérébrale est modulée par la température du bain, l'activité neuronale spontanée de larves de poisson-zèbre a été enregistrée à l'aide du microscope à nappe de lumière décrit à la section II.2.1a), sous différentes températures, grâce au système de régulation de la température décrit à la section II.2.1b). Enfin, les signaux sont extraits selon le *pipeline* décrit en section II.2.2.

L'analyse de l'activité spontanée se révèle complexe. En effet, en l'absence de stimulation transitoire avec une base de temps pré-définie, nous perdons la possibilité d'extraire une réponse déterministe comme présenté dans la section II.2. On se retrouve ainsi avec l'activité d'une dizaine de milliers de neurones, très variable entre individus. Si cette activité a tendance à être moindre qu'en présence de stimulation ponctuelle, elle est néanmoins riche, comme l'atteste la courbe noire de la figure II.24 qui montre l'écart entre activité spontanée et bruit.

Pour traiter cette complexité, plusieurs approches existent. Des méthodes numériques de réduction de dimensionnalité peuvent être employées pour diminuer le nombre d'objet à analyser tout en conservant les propriétés statistiques observées. Un exemple d'une telle méthode est montrée en annexe A. Une autre méthode consiste à simplement se concentrer sur une petite fraction des neurones enregistrés, par exemple un circuit dont la fonction a été étudiée. C'est ce qu'on propose de faire dans cette section.

L'ensemble de cette section rapporte une étude réalisée en collaboration avec Sébastien Wolf, Rémi Monasson et Simona Cocco du Laboratoire de Physique Théorique de l'ENS (Paris, France), qui fait l'objet d'un article en préparation [117].

III.2.1 L'ARTR, un circuit contrôlant la direction de la nage

L'ARTR, pour *anterior rhombencephalic turning region* (région liée à la réorientation située dans le rhombencéphale antérieur) [46], qui fut appelé un temps HbO pour *hindbrain oscillator* (oscillateur situé dans le rhombencéphale) [96, 47], est un petit circuit composé d'une centaine de neurones distribués de manière symétrique de part et d'autre de l'axe rostro-caudal. Ce circuit montre de lentes alternances gauche/droite, où l'activité est successivement maintenue sur des temps de l'ordre de la dizaine de secondes de chaque côté. Parfois, ces alternances présentent des régimes quasi-périodiques, d'où l'appellation HbO. Cependant, la nature oscillatoire de ce circuit n'est pas systématique et c'est pourquoi l'appellation ARTR, qui inclut sa fonction, fait désormais consensus.

Initialement révélé par M. Ahrens *et. al.* [96], la fonction de ce circuit a été déterminée par T. Dunn *et. al.* [46]. L'ARTR est identifié par régression avec les traces des mouvements de queue virtuels (la larve est immobilisée mais des électrodes enregistrent l'activité des axones des neurones moteurs [27, 96]). La partie gauche de l'ARTR, en vert sur la figure III.1A, est accordée avec les mouvements vers la gauche tandis que la partie droite (magenta) est accordée avec les mouvements vers la droite. S. Wolf *et. al.* [47] ont montré que les saccades oculaires du poisson, qui consistent en de brusques changements de direction des deux yeux, sont hautement corrélées avec les mouvements de queue : le poisson-zèbre se déplace vers là où il regarde. Ces saccades sont utilisées comme indicateur de la direction de la nage, permettant de révéler le même circuit (entre autre) par régression avec le mouvement des yeux (figure III.1B, cluster ③). Cette analyse montre également que l'ARTR semble faire partie d'un plus vaste réseau organisant la dynamique oculaire (en jaune et vert).

L'examen des signaux moyens de chaque côté du circuit révèle une activité antiphasique : lorsque le côté droit est actif, le côté gauche ne l'est pas et vice-versa (figure III.1C, gauche). De plus, une saccade oculaire est systématiquement accompagnée d'une bouffée d'activité du sous-circuit ipsilatéral (du même côté).

L'ablation du côté gauche de l'ARTR diminue de manière significative la fréquence des mouvements de ce côté (figure III.1D, vert) tandis qu'une ablation du côté contralatéral (droite) augmentent la fréquence de ce type de mouvement (magenta), confirmant le rôle de l'ARTR dans la prise de décision sur la direction de la nage.

De manière intéressante, dans [46], le poisson est paralysé. Même sans sortie physique réelle, l'ARTR continue son activité de manière spontanée. Ceci est confirmé dans [47], où l'ARTR d'une larve entièrement immobilisée dans l'agarose continue ses alternations gauche/droite antiphasiques (figure III.1E).

L'ARTR est donc un circuit fortement impliqué dans la direction de la nage, elle-même étant un élément critique dans les processus d'exploration. Sa dynamique a été décrite avec des modèles minimaux où chaque sous-circuit s'auto-excite et inhibe l'autre. Cela a notamment permis de correctement capturer des propriétés de renforcements des persistances dans l'un ou l'autre état (gauche ou droite) en fonction de l'intensité lumineuse reçue dans chaque œil [47]. Ce type de modèle minimal a également permis de faire la lumière sur la probabilité de changement de direction p_{flip} (voir section III.1) et sa modulation en fonction du contraste, responsable de la navigation vers une source de lumière (phototaxie) [48].

L'ARTR est également impliqué dans des processus d'apprentissage directionnel, où une larve de poisson-zèbre doit choisir la bonne direction pour mettre fin à une stimulation nocive [107]. L'activité de ce circuit, avec la partie anti-corrélée située dans le cervelet (le

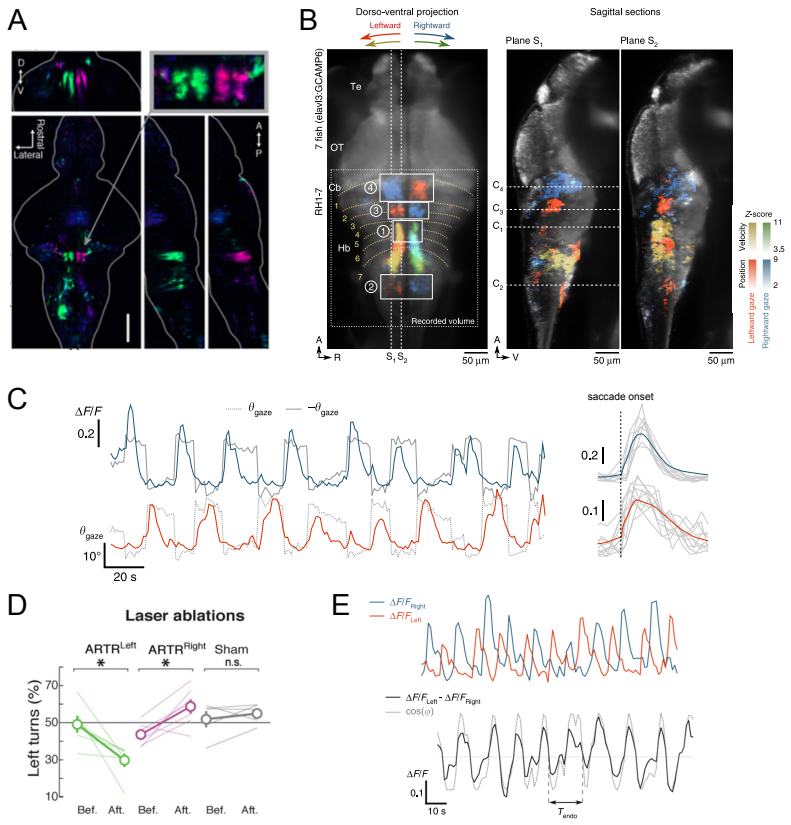


Fig. III.1 *L'ARTR contrôle la direction des mouvements.* ***A*** *L'ARTR révélé par régression avec l'activité des neurones moteurs. En vert (magenta), les neurones accordés avec les mouvements vers la gauche (droite, respectivement).* ***B*** *L'ARTR révélé par régression avec le mouvement des yeux. En rouge (bleu), les neurones accordés avec la position des yeux vers la gauche (droite, respectivement), en jaune (vert) les neurones accordés avec la vitesse des yeux vers la gauche (droite, respectivement). L'ARTR correspond au cluster ③.* ***C*** *(Gauche) Exemple de traces moyennes des neurones inclus dans la partie ③ de* ***B****. En trait gris plein l'angle du regard, en gris tirets son opposé. (Droite) Moyenne peri-saccades ipsilatérales.* ***D*** *Effet de l'ablation sur la quantité de tournant vers la gauche. Vert, ablation de la partie gauche, magenta, ablation de la partie droite. Sham : ablation aléatoire autre part que dans l'ARTR, dans le rhombencéphale.* ***E*** *Exemple de traces de la partie gauche (rouge) et droite (bleu) de l'ARTR d'un poisson entièrement immobilisé dans l'agarose. Trace noire : différence entre les deux parties, faisant apparaître de lentes (> 10 secondes) alternances entre les deux côtés.* ***A*** *et* ***D*** *tiré de [46], les autres panels sont tirés de [47].*

cluster ④ de la figure III.1B), est renforcée au fil des essais à succès, suggérant une forme d'apprentissage qui conduit à un biais dans les temps de persistance dans l'état actif de la partie (gauche ou droite) concernée.

Finalement, le rôle important de l'ARTR dans les prises de décision sur la direction de la navigation et son activité spontanée qui permet de modifier cette navigation en l'absence de toute stimulation en font un objet d'étude intéressant dans le cadre de modulation de l'activité neuronal causée par la température du bain.

III.2.2 Procédure expérimentale d'enregistrement de l'ARTR

On dispose donc du signal de larges fractions du cerveau de 12 poisson-zèbres enregistrés à plusieurs températures, les mêmes que pour le comportement (18, 22, 26, 30 et 33°C), grâce au microscope à nappe de lumière dont le bassin est régulé en température (figure III.2A). Chaque jeu de données consiste en une trace temporelle durant 20 minutes, pour tous les neurones segmentés. Pour identifier les neurones appartenant à l'ARTR, une procédure semi-automatique est employée [118].

Pour une couche choisie de telle sorte que l'ARTR y est imagé, la matrice de corrélation de tous les neurones de la couche est calculée. Puis, l'utilisateur cherche anatomiquement un neurone situé vers la région des rhombomères 1 et 2, près de l'axe rostro-caudal, jusqu'à trouver un neurone qui fait apparaître la structure de corrélation/anti-corrélation propre à l'ARTR. Ce signal sert ensuite comme corrélateur pour les autres couches. Les neurones les plus (anti-)corrélés sont affichés, et l'utilisateur détermine à la main lesquels sont à inclure dans l'ARTR. Pour la couche suivante, l'ensemble des signaux précédemment extraits sont utilisés comme corrélateurs, et ainsi de suite jusqu'à que toutes les couches soient traitées.

Un exemple de matrice de corrélation obtenue sur l'ensemble des neurones de l'ARTR d'un individu obtenu avec cette méthode est montré en figure III.2B. On identifie aisément les deux parties anti-corrélées du circuit. La localisation anatomique de tous les neurones faisant partie de l'ARTR provenant de tous les poissons analysés (alignés sur le cerveau de référence du ZBrain) est montrée en figure III.2C, en rouge la partie gauche, en bleu, la partie droite. On remarque que l'on a perdu ici la structure en double bande que l'on peut voir dans la figure III.1A-B. Ceci est dû au fait que l'ARTR est précisément situé au niveau des rares pigments exprimés par les larves nacres, réduisant la qualité de la segmentation dans cette région. Néanmoins, les deux sous-groupes sont bel et bien hautement anti-corrélés, comme en atteste un exemple de matrice d'activité présentée en figure III.2D. L'activité des neurones individuels après déconvolution par BSD (voir section II.2.2) y est montrée en couleur, tandis que la couleur noire représente les temps

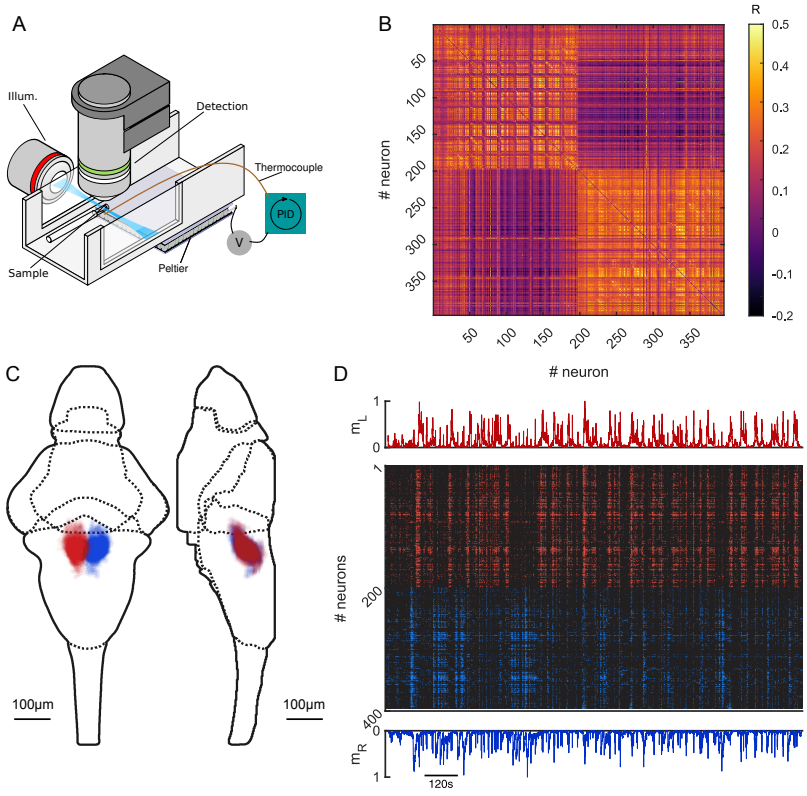


Fig. III.2 *Localisation de l'ARTR.* ***A*** *Schéma du microscope à nappe de lumière avec régulation en température.* ***B*** *Matrice de corrélation des neurones d'un poisson exemple formant l'ARTR.* ***C*** *Projection de tous les neurones de 12 larve de poisson-zèbres identifiés comme faisant partie de l'ARTR, en z (gauche) et en x (droite). En rouge, la partie gauche, en bleu, la partie droite.* ***D*** *Matrice d'activité des neurones de l'ARTR gauche (rouge) et droit (bleu), provenant du même poisson que dans* ***B*** *et activités moyennes des sous-groupes, m_L et m_R.*

sans activité. On y remarque qu'au sein d'un sous-groupe (gauche et droite, rouge et bleu respectivement), tous les neurones se comportent collectivement, avec des périodes actives/inactives synchronisées et en anti-phase avec l'autre sous-groupe.

Lorsqu'un même poisson est imagé à plusieurs températures, l'outil CMTK est utilisé pour convertir la segmentation du premier enregistrement au(x) suivant(s) afin de conserver les mêmes neurones d'une expérience à l'autre. Les indices des neurones inclus dans l'ARTR sont sauvegardés et on va pouvoir regarder l'effet de la température de l'eau sur leurs dynamiques. On dispose des neurones de l'ARTR de 12 poissons différents, pour un total de 28 expériences réalisées à 5 températures différentes, avec en moyenne par poisson 145±65 neurones dans le sous-circuit gauche et 165±69 neurones dans le sous-circuit droit (moyenne±écart-type).

III.2.3 L'activité de l'ARTR est modulée par la température

Remise en contexte comportemental Prenons un peu de recul. On a vu dans la section III.1 dans quelle mesure la température du bain impacte les statistiques locomotrices. Plus particulièrement, on a montré que les conditions thermiques ont une influence importante sur la dynamique de réorientation. Notamment, la probabilité de changer de direction de nage p_{flip} augmente avec la température. La description de l'ARTR de la section III.2.1 en font un bon candidat pour expliquer la base neuronale des observations comportementales. Pour permettre une comparaison directe entre comportement et imagerie calcique, on va adopter une approche différente pour extraire l'équivalent temporel de p_{flip}, dénoté k_{flip}. C'est effectivement ce taux qui pourrait trouver sa contrepartie neuronale puisque les circuits neuronaux ont une activité continue.

La méthode se base sur le même principe que celui décrit dans l'article présenté dans la section III.1.2. La larve de poisson-zèbre enchaîne les mouvements dans la même direction, ponctués de mouvements "tout-droit". Cela donne lieu a des trajectoires comme celle montrée en figure III.3A. On sait que l'ARTR détermine la direction des mouvements et on fait l'hypothèse qu'un mouvement "tout-droit" n'impacte pas ces alternances gauche/droite. En comportement, nous n'avons pas accès à ce signal, mais lorsque le poisson fait un mouvement de type "tournant", on a une lecture ponctuelle et aléatoire de l'état de l'ARTR, gauche ou droite, et on peut donc reconstruire approximativement le signal caché. Avec un grand nombres de séquences de mouvement binarisé gauche/droite telle que celle illustrée en figure III.3B (flèches rouges et bleues), on dispose d'un grand nombre de traces putatives (en noir), représentant l'alternance des états gauche et droit.

Un processus dans lequel à chaque pas de temps un système à deux états a une probabilité par unité de temps (notée k_{flip}, donc) d'en changer s'appelle un bruit télégraphe

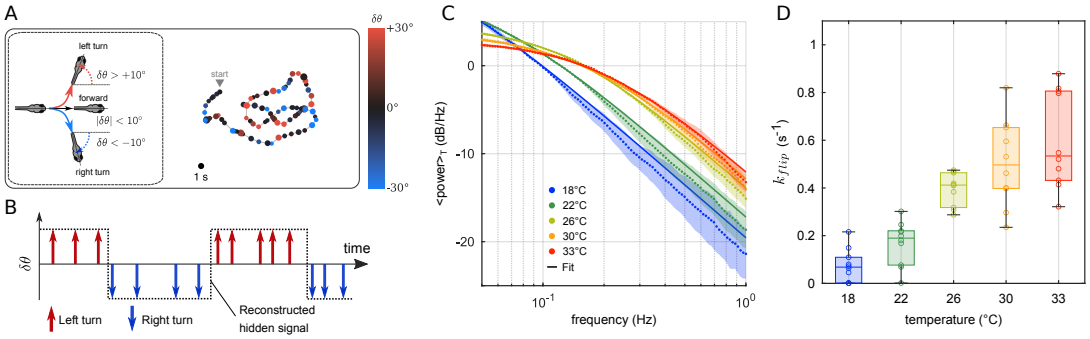


Fig. III.3 *Effet de la température sur la dynamique de réorientation.* ***A*** *Exemple de trajectoire enregistrée à 26°C. Un point représente un mouvement, sa taille encode le temps passé à cet endroit et sa couleur encode l'angle de réorientation. Encadré : schéma de l'arbre décisif : le poisson va soit en face, soit à droite (bleu) soit à gauche (rouge).* ***B*** *Schéma du signal directionnel putatif caché (tirets noirs), que la direction des mouvements permet d'échantillonner aléatoirement (flèches rouges et bleues).* ***C*** *Densités spectrales de puissance moyennées par température du signal en noir dans* ***B****. Les points sont les données moyennées, l'aire ombragée l'erreur standard et le trait plein l'ajustement Lorentzien.* ***D*** *Boxplot des taux de changement de direction k_{flip} extraits par les ajustements lorentziens par expérience et par température. Un point représente un lot de 10 poissons, la boîte s'étend du premier au troisième quartiles, les moustache sur environ 2.7 écart-types et la barre horizontale correspond à la médiane.*

(ou bruit en créneaux), dont on peut calculer la fonction d'autocorrélation et en dériver la densité spectrale de puissance [119], qui est décrite par une fonction lorentzienne centrée en 0 :

$$S(f) = \frac{4Ik_{flip}}{4k_{flip}^2 + (2\pi f)^2}$$

avec I l'amplitude du signal en créneaux, f la fréquence et k_{flip} la probabilité par unité de temps d'inversion du système. L'inverse de ce dernier correspond au temps moyen passé dans l'un ou l'autre état (que l'on présume être égal).

Pour chaque trace reconstruite, une densité spectrale de puissance est calculée, puis elles sont moyennées par température comme montré en figure III.3C. On observe des différences significatives entre températures, notamment la fréquence de coupure, à partir de laquelle la densité chute exponentiellement, semble augmenter avec la température. Cela suggère qu'une haute température limite le temps passé dans un état, qui pourrait être expliqué par une diminution du temps de maintien dans l'état actif de chaque sous-

circuit de l'ARTR.

Un ajustement Lorentzien est réalisé pour chaque lot de 10 poissons aux 5 températures testées, conformément à l'équation III.2.3. Les résultats sont présentés dans la figure III.3D. Une variabilité non-négligeable est présente au sein d'une même température, notamment au delà de 26°C mais on y observe une augmentation globale des valeurs médianes de k_{flip}, en accord avec ce qui a été décrit dans la section III.1 où le taux de retournement avait été extrait grâce à la fonction d'autocorrélation. Cette dernière est moins aisée à utiliser dans le cas de lent maintien dans un état, avec une durée d'expérience relativement courte et des données beaucoup plus bruitées, comme c'est le cas des données neuronales. Avec la densité spectrale de puissance, on dispose d'un outil plus robuste et maniable qui va permettre une comparaison directe entre comportement et données d'imagerie calcique fonctionnelle.

L'alternance gauche/droite de l'ARTR est thermiquement modulée en accord avec le comportement Reprenons les données neuronales. Pour chaque expérience, les traces inférées par BSD sont moyennées pour générer les signaux moyens gauche et droite, dénotés m_L et m_R, respectivement. Pour imiter les signaux télégraphes obtenus en comportement (voir figure III.3B), on calcule la différence $m_L - m_R$ et la trace résultante est binarisée entre -1 et +1 : les valeurs positives sont mises à +1 tandis qu'on assigne -1 aux valeurs négatives. Ainsi, lorsque le signal vaut +1, l'ARTR est dans l'état gauche, lorsqu'il vaut -1, il est dans l'état droite. Des exemples de courbes pour 3 températures issues du même animal sont montrées dans la figure III.4A. Qualitativement, on observe une accélération du rythme du circuit, avec des temps de persistance plus longs à 22°C qu'à 30°C.

Les densités spectrales de puissance ont été calculées de la même façon que dans le paragraphe précédent et moyennées par température. Les courbes issues de ce calcul sont montrées en figure III.4B. Comme pour le comportement, on observe une augmentation de la fréquence de coupure à haute température. Ceci est confirmé par l'ajustement lorentzien qui permet d'extraire la taux de retournement, noté ici ν, et montré pour chaque expérience en figure III.4C. L'augmentation semble moins linéaire que pour le comportement, on observe plutôt deux régimes, l'un à 18–22°C et l'autre à 26–30°C. Néanmoins, pour les cas où l'on dispose du même poisson à plusieurs températures, l'augmentation de ν est quasiment systématique, comme le montrent les lignes grises qui relient les points correspondants au même poisson.

Pour chaque température, la moyenne des k_{flip} issus du comportement et des ν issus des données de l'ARTR sont calculées et comparées en figure III.4D. On obtient un très bon accord entre les deux (pente de 0.81, $R = 0.99$), suggérant que (1) l'ARTR est bien

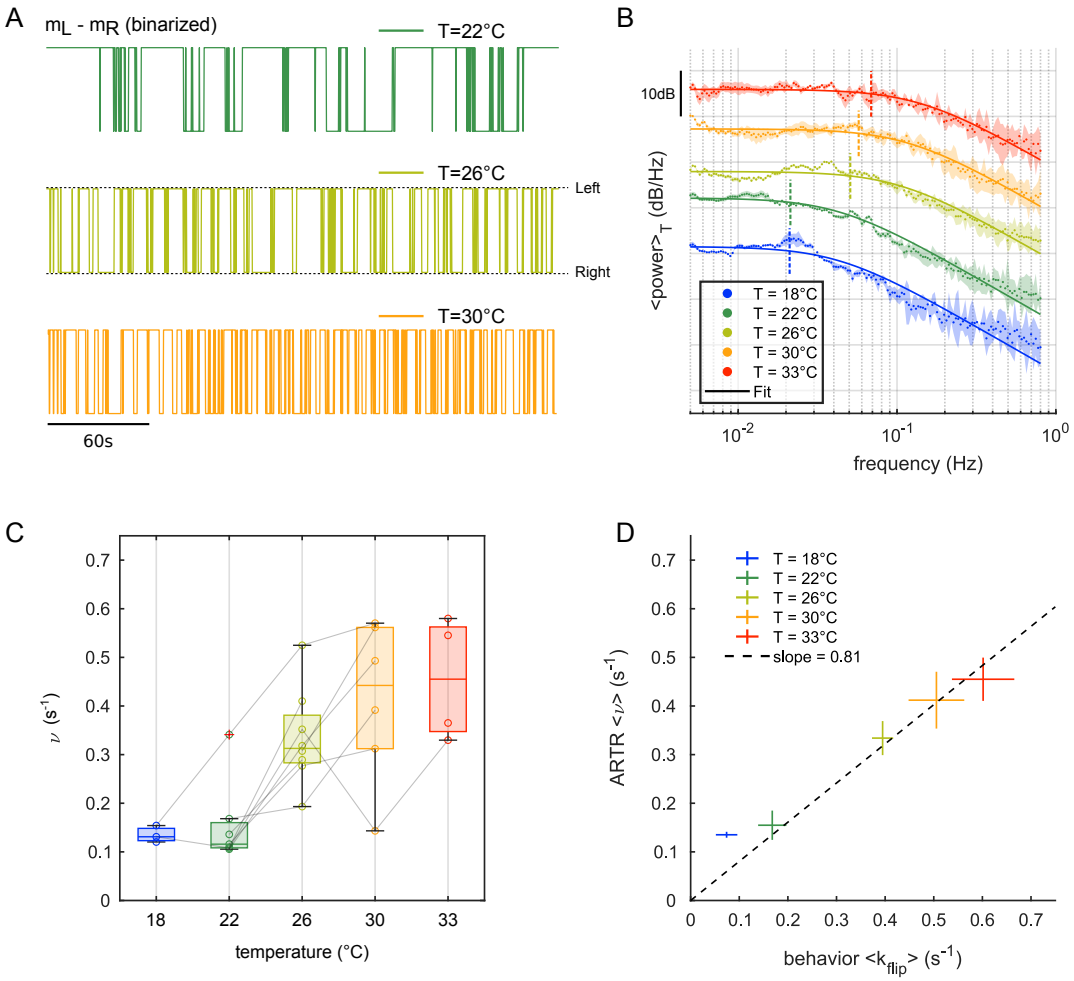


Fig. III.4 *La modulation thermique de l'ARTR est compatible avec les données comportementales.* ***A*** *Exemple de traces du signal de l'ARTR (gauche - droite) binarisé à 3 températures pour le même poisson.* ***B*** *Densités spectrales de puissance moyennées par température des signaux de l'ARTR. Les points sont les données moyennées, l'aire ombragée l'erreur standard et le trait plein l'ajustement lorentzien. Les tirets verticaux indiquent le taux issu de l'ajustement.* ***C*** *Boxplot des taux de changement d'état gauche/droite ν issus des ajustements lorentziens par expérience et par température.* ***D*** *Comparaison entre k_{flip} obtenu via le comportement et ν issus des spectres de l'ARTR. La ligne pointillée représente l'ajustement linéaire ax, la pente est de 0.81.*

impliqué dans la dynamique de réorientation et que (2) l'effet de la température sur cette dynamique trouve sa source dans la modulation de la fréquence d'alternance de l'ARTR.

Les cartes d'activité de l'ARTR sont modulées par la température Jusqu'ici, on a considéré l'ARTR dans son ensemble, traduit par la différence $m_L - m_R$, binarisée en -1 et +1. On peut regarder plus en détail l'activité moyenne de chacun des deux sous-circuits gauche/droite. Pour cela, on rééchelonne les activités moyennes m_L et m_R entre 0 et 1 pour pouvoir comparer les traces d'un poisson à l'autre puis elles sont rééchantillonnées en 10 bins. Ensuite, on calcule leur densités de probabilités jointes (sur $10 \times 10 = 100$ intervalles), affichées en échelle logarithmique pour trois températures dans la figure III.5A, avec un aperçu de 10 minutes des traces d'activités en figure III.5B. Les cartes d'activités à trois températures différentes montrent qu'à haute température, il y a une déplétion des hautes activités, se traduisant par de rapides excursions de chaque sous-circuit dans un état actif suivi d'un rapide retour à un état inactif. À l'inverse, aux plus basses températures, on a une augmentation globale de l'activité, y compris des co-activations des parties gauche et droite plus fréquentes et des temps de maintien dans un état haut plus long.

Pour visualiser cet effet, on calcule la densité de probabilités uni-dimensionnelles de chacun des m_L et m_R en les distinguant par température, comme montré en figure III.5C. Pour les petites valeurs d'activité, les probabilités sont croissantes avec la température, tandis qu'on observe une décroissance plus lente à basse température. Cela se traduit par une diminution de la moyenne de la distribution avec la température, malgré une forte variabilité inter-individuelle (figure III.5D). La différence notable dans les distributions rappelle celle qu'on peut observer dans les temps de maintien dans les états actifs décrit dans le paragraphe précédent. Les paysages d'activité décrivant les patrons d'activations de chacun des deux côtés, on s'attend en effet à ce qu'ils traduisent la dynamique du réseau. Pour s'en convaincre, on regarde la relation entre temps de persistance dans un état actif ($m_{L,R} > 0.1$) et la moyenne des deux sous-populations (figure III.5E). Ces temps de persistance sont définis comme le temps consécutif passé au dessus d'un seuil arbitraire. On trouve une relation quasi-linéaire entre les deux ($R = 0.91$), démontrant ainsi la dépendance de ces deux aspects (dynamique du circuit et paysage d'activité). Pour vérifier si le seuil définissant l'état "haut" (ici mis à 0.1) impacte cette observation, plusieurs seuils sont testés : les valeurs changent de concert et la dépendance linéaire ne change pas.

III.2.4 Un modèle d'Ising capture la dynamique de l'ARTR

Les fonctions cognitives complexes requièrent le stockage d'informations sur des temps longs (plus de dix secondes) [120], par exemple l'enregistrement de la position des yeux ou

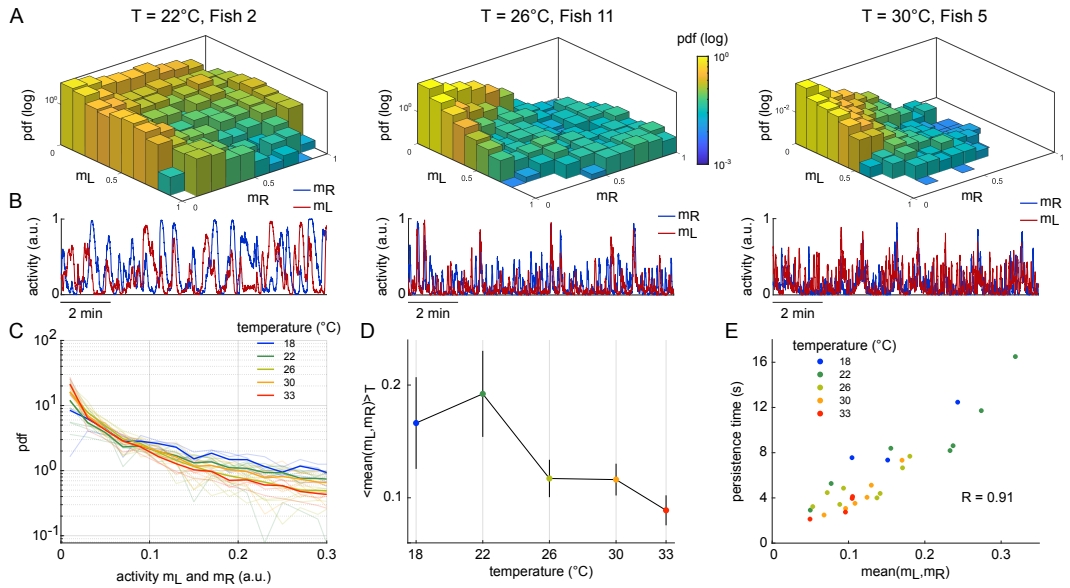


Fig. III.5 *La température détermine l'espace d'activité.* ***A-B*** *Trois exemples de distributions (**A**) des activités moyennes des parties gauche (m_L) et droite (m_R) de l'ARTR et l'activité correspondante pour trois poissons différents (**B**) à trois températures différentes.* ***C*** *Distribution en une dimension des m_L et m_R. Traits transparents : courbes pour une expérience. Traits gras : moyennes par température.* ***D*** *Premier moment de la distribution montrée en **C** en fonction de la température.* ***E*** *Relation entre le premier moment de la distribution et le temps de persistance moyen dans l'état actif (mL ou $m_R > 0.1$). Chaque point correspond à une expérience.*

de la tête, ou encore des représentations plus abstraites. Cela se traduit par un maintien de l'activité plus long que l'activité neuronale liée à un réflexe par exemple, comme c'est le cas de l'ARTR. Si cette activité persistante peut-être due à des propriétés cellulaires de neurones individuels spécifiques, elle peut également être une propriété émergente de l'architecture du circuit [121]. Un certain nombre de modèles ont été développé pour expliquer la persistance, se basant sur des attracteurs, c'est à dire des états stables vers lequel se dirige spontanément le système [122]. Cependant, trouver leur contrepartie biologique reste ardu, notamment parce que ce genre de modèle implique un grand nombre de neurones et est très sensible à la connectivité du réseau [123, 124]. Les récentes avancées en apprentissage automatique combinées aux données neuronales fonctionnelles présentées ci-dessus offre une possibilité de sonder directement le réseau de neurones dans de vrais circuits. Les modèles graphique basés sur l'énergie, tels que les modèles d'Ising, sont ainsi

construits en imitant l'organisation du réseau biologique où les composants du réseau sont connectés les uns autres par le biais d'une matrice de connectivité fonctionnelle, comme le sont les neurones. Ils ont été utilisés avec succès ces dernières années pour décrire plusieurs types de systèmes, comme la rétine de la salamandre [125, 126], le cortex [127, 128] et l'hippocampe du rat [129] et de la souris [130].

Ici, on se propose d'utiliser ce modèle pour tester sa capacité à reproduire la propriété de persistance d'activité du réseau et sa dépendance en température.

Inférence du modèle d'Ising à partir des données On considère ici l'activité de la population de neurones étudiée, l'ARTR, comme une collection de configurations correspondantes aux traces d'activités binarisées de chaque neurone. Le temps est découpé en fenêtres de 100 ms, dans laquelle l'activité s_i du neurone i vaut 1 si le neurone est actif ou 0 s'il est silencieux (inactif). La configuration du système dans la fenêtre temporelle k est alors donnée par $\boldsymbol{s^k} = (s_1^k, s_2^k, .., s_N^k)$ où N est le nombre total de neurones considérés. On cherche la distribution de probabilités d'observer la configuration $\boldsymbol{s}$, $P(\boldsymbol{s})$. Comme il existe 2^N configurations, on va plutôt chercher $P(\boldsymbol{s})$ telle que l'activité moyenne de chaque neurones $\langle s_i \rangle$ et leur corrélations de paire $\langle s_i s_j \rangle$ soient respectées par le modèle. La solution la moins structurée, c'est à dire imposant le moins d'hypothèse sur le système, est obtenue en minimisant l'entropie de la distribution [131]. Cette solution est la distribution de Boltzmann :

$$P(\boldsymbol{s}) = \frac{1}{Z} \exp\left(-E(\boldsymbol{s})\right)$$

avec Z une constante de normalisation et où l'argument de la fonction exponentielle correspond à l'énergie associée à la configuration $\boldsymbol{s}$, donnée par :

$$E(\boldsymbol{s}) = -\sum_i h_i s_i - \sum_{i<j} J_{ij} s_i s_j$$

avec h_i le champs lié au neurone i et la matrice J contenant les couplages entre toutes les paires de neurones, représentant la connectivité fonctionnelle du réseau.

Le scénario décrit ci-dessus, dans lequel une série d'éléments (les neurones) ont deux états possibles (actif ou inactif) et sont couplés les uns aux autres (les corrélations de paires) correspond à un modèle d'Ising, initialement développé pour expliquer les changements de phase observés dans les matériaux ferromagnétiques. Dans ce dernier, les neurones sont remplacés par des particules et leurs activités par des moments magnétiques de spin, qui ne peuvent, de la même manière que les neurones, prendre que deux valeurs. Construire le modèle consiste alors à trouver la matrice des couplages J_{ij} et les champs h_i de telle sorte que les activités moyennes et les corrélations de paires observées soient concordantes. Les étapes permettant cela sont décrites dans la figure III.6.

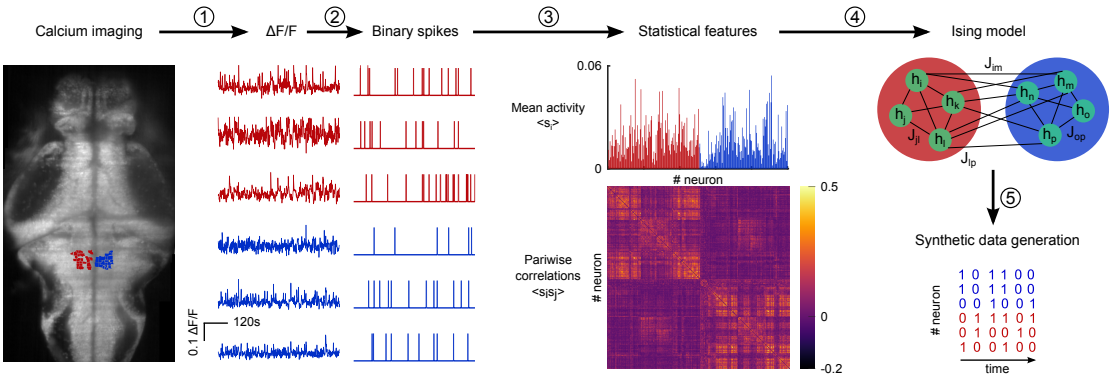


Fig. III.6 *Processus de travail pour l'inférence du modèle d'Ising.* ① *À partir de la fluorescence brute, le* $\Delta F/F$ *est calculé pour les neurones de l'ARTR.* ② *Les traces sont déconvoluées avec BSD pour obtenir des potentiels d'actions binaires. Le temps est discrétisé en fenêtre de 100ms.* ③ *Les caractéristiques statistiques, activité moyenne (haut) et corrélations de paires (bas) sont calculées.* ④ *Les couplages* J_{ij} *et les champs* h_i *sont inférés avec l'algorithme ACE [132, 133].* ⑤ *La distribution résultante est échantillonnée par l'algorithme de Metropolis-Hastings pour générer des signaux synthétiques.*

Ce processus est réalisé pour les 28 expériences dont nous disposons. L'étape ④, c'est à dire l'inférence de la connectivité fonctionnelle J_{ij} et des champs pour chaque neurone h_i, est assuré par l'algorithme *adaptive cluster expansion* (ACE) [132, 133].

Un exemple de matrice J obtenue de cette façon est montré en figure III.7A. Les champs inférés sur le même jeu de données sont montrés en figure III.7D. En regroupant les moyennes des couplages entre neurones ipsilatéraux (du même côté) et entre neurones contralatéraux, on observe que la médiane du couplage dans ce dernier cas est légèrement négative tandis que les couplages entre neurones du même côtés sont essentiellement positifs, comme le montre la figure III.7B. Les moyennes des champs pour chaque expérience, quant à eux, sont assez variables (figure III.7E, droite), traduisant potentiellement des rôles différents de chaque neurones.

Une fois les champs et les matrices de connectivités fonctionnelles inférées, la distribution de Boltzmann $P(\boldsymbol{s})$ donnant la probabilité d'observer une configuration $\boldsymbol{s}$ est connue. Pour générer des données à partir de cette distribution, il faut l'échantillonner pour recréer un jeu de données. Une classe d'algorithmes permettant cela sont ceux de Monte-Carlo, qui échantillonnent aléatoirement une distribution pour créer pas à pas un signal synthétique. Plus précisément, l'algorithme de Metropolis-Hastings est utilisé ici. Dans ce dernier, on part d'une configuration de départ $\boldsymbol{s_i}$. Une configuration $\boldsymbol{s_i^*}$ est choisie

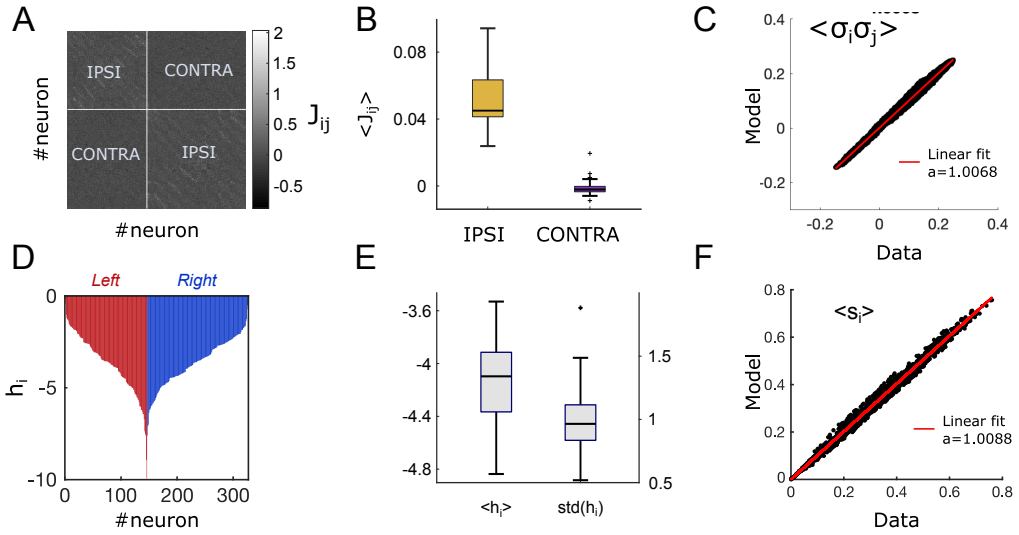


Fig. III.7 *Résultat de l'inférence des paramètres du modèle d'Ising.* ***A*** *Exemple de matrice de connectivité fonctionnelle, J.* ***B*** *Couplages moyennés par expérience en distinguant les paires de neurones ipsilatéraux (vert) et contralatéraux (violet).* ***C*** *Exemple de comparaison entre les corrélations de paires mesurées dans les données et sur les simulations Metropolis-Hastings.* ***D*** *Exemple de champs h_i de chaque neurones de la partie gauche (rouge) et droite (bleue) de l'ARTR.* ***E*** *Champs moyennés par expérience (gauche) et écart-type des champs pour chaque expérience (droite).* ***F*** *Exemple de comparaison entre activités moyennes de chaque neurone entre données et simulations Metropolis-Hastings.*

aléatoirement parmi les configurations accessibles au système depuis la configuration de départ. Dans le cas du modèle d'Ising, les configurations accessibles sont celles où seul un spin (neurone) change de valeur. L'énergie correspondante $E(\boldsymbol{s}_i^*)$ est alors calculée grâce à l'équation III.2.4, puis comparée à l'énergie de la configuration précédente $E(\boldsymbol{s}_i)$. Si l'énergie de la nouvelle configuration est inférieure à celle de la configuration précédente, la nouvelle est acceptée. Si elle est supérieure, elle n'est acceptée qu'avec une probabilité $p = \exp\left(-(E(\boldsymbol{s}_i^*) - E(\boldsymbol{s}_i)\right)$, autrement, elle est rejetée et le système reste dans la configuration $\boldsymbol{s}_i$. À la fin, le signal généré de cette façon a la bonne distribution de probabilité [134]. Le temps sur lequel est produit le signal est compté en *Monte-Carlo rounds*, où un *round* correspond à N (le nombre de neurones) fois le nombre d'itération de l'algorithme décrit ci-dessus.

En générant de nouveaux jeux de données, on peut vérifier que le modèle conduit à

la bonne reproduction des caractéristiques statistiques sur lesquelles il est entraîné. La figure III.7C montre un très bon accord entre les corrélations de paires (pente de 1.0068) tandis que la figure III.7F confirme la bonne reproduction de l'activité moyenne de chaque neurones (pente de 1.0088). On va pouvoir regarder plus en détail comment se comportent ces données synthétiques vis-à-vis de leurs équivalents réels.

Les simulations numériques basées sur le modèle reproduisent les données Pour chaque expérience, on dispose d'un modèle d'Ising (connectivité et activités moyennes) qui définit un paysage énergétique correspondant à une distribution de probabilités d'observer les configurations donnant l'état de tous les neurones. Ainsi, on peut générer de nouvelles traces d'activité pour chaque neurone de l'ARTR, et ce pour chaque expérience, par échantillonage de Metropolis-Hastings.

Les cartes d'activités moyennes m_L, m_R obtenues de cette façon, à partir du modèle entraîné sur les trois mêmes jeux de données que celles présentées en figure III.5A, sont montrées en figure III.8A, avec un aperçu de l'évolution temporelle correspondante en figure III.8B. Les signaux générés semblent reproduire les lentes alternations gauche/droite, conduisant à des paysages d'activités semblables. Cela est non-trivial puisque le modèle d'Ising est un modèle énergétique, indépendant du temps, suggérant que la dynamique de l'ARTR est essentiellement contrôlée par son paysage énergétique.

Pour confirmer quantitativement la reproduction des cartes d'activité par le modèle, on calcule la divergence de Kullback-Leibler entre les jeux de données réelles et les simulations issues du modèle d'Ising correspondant (figure III.8C, vert). Ces valeurs sont ensuite comparées à celles calculées sur les autres paires données/simulations (figure III.8C, rouge). La divergence de Kullback-Leibler est un indicateur de la similitude entre deux distributions, son inverse représente le nombre de jeu de données qu'il faut observer pour déterminer si les deux distributions sont différentes. Cette comparaison montre ainsi que les cartes d'activités sont bien reproduites par les modèles.

On a vu que l'activité moyenne de chaque neurone est correctement reproduite par les simulations, par construction. Pour vérifier si cette concordance se propage aux moyennes des sous-populations m_L et m_R, qui, on l'a vu, est étroitement lié aux temps de persistance dans chacun des états gauche et droite (figure III.5E), les moyennes de m_L et m_R calculées à partir des simulations sont tracées en fonction de ces quantités issues des données réelles (figure III.8D). Les points, qui représentent chacun une paire données/simulation, sont étroitement organisés autour de l'axe $y = x$ et hautement corrélé ($R = 0.95$). Notamment, la dépendance en température est reproduite, avec par exemple les moyennes à haute température qui sont confinées aux basses valeurs d'activités. De la même façon, les temps de persistance calculées sur les simulations révèlent une dépendance quasi-linéaire (figure

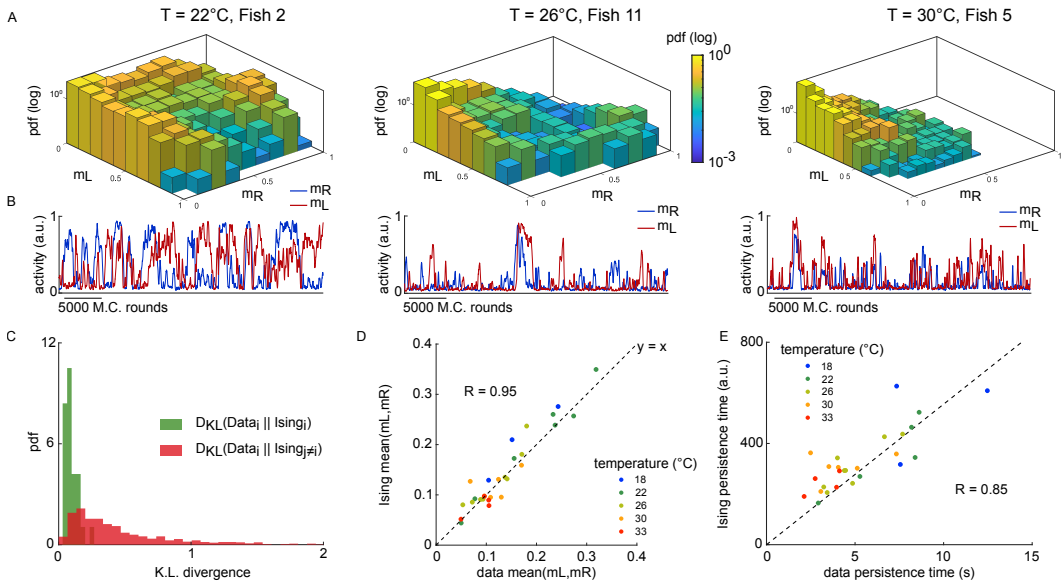


Fig. III.8 *Le modèle d'Ising inféré sur les données capture le comportement de l'ARTR.* ***A-B*** *Trois exemples de distributions (**A**) des activités moyennes des parties gauche (m_L) et droite (m_R) de l'ARTR provenant de simulations issues des mêmes jeux de données que ceux de la figure III.5A-B et l'activité correspondante pour trois jeux de données différents (**B**) à trois températures différentes.* ***C*** *Divergence de Kullback-Leibler entre les distributions issues d'un jeu de données expérimentales et simulées. Vert, comparaison entre le modèle d'Ising et les données sur lesquelles il a été entraîné. Rouge, comparaison entre le modèle d'Ising et tous les autres jeux de données expérimentales.* ***D*** *Relation entre premier moment de la distribution des m_L et m_R pour les données expérimentales (abscisses) et pour les simulations Ising (ordonnées).* ***E*** *Relation entre les temps de persistance pour les données (abscisses) et pour les simulations Ising (ordonnées). La ligne pointillée est un ajustement linéaire permettant la conversion temps en seconde à temps en MC rounds.*

III.8E, $R = 0.85$). L'ajustement linéaire $y = ax$ donne une pente de $56 M.C.rounds/s$, qui permet une conversion entre temps réel et temps de simulation.

III.2.5 Discussion

On s'est concentré ici sur un circuit neuronal, l'ARTR, qui contrôle la direction de la nage du poisson. La modulation de la dynamique de réorientation par la température d'une larve en nage libre a été quantifiée : les changements de direction sont plus fréquents à haute température, se rapprochant d'une marche aléatoire non biaisée alors que la larve a tendance à accumuler les mouvements dans la même direction à basse température. L'étude de la dynamique de l'ARTR montre que son régime pseudo-oscillant entre partie droite et partie gauche est modulée de la même façon par la température. On a montré que le paysage d'activité de la population de neurones composant ce circuit contrôle les temps de persistance dans l'un ou l'autre côté. Bien qu'il existe une forte variabilité d'un individu à l'autre, la modulation de ces paysages par la température explique les changements dans les temps de persistance du circuit et de fait les temps caractéristiques de maintien de la direction de la nage.

Un modèle d'Ising entraîné sur des données d'imagerie fonctionnelle permet de générer de nouvelles traces d'activités synthétiques. Bien que le modèle soit énergétique, indépendant du temps, les dynamiques temporelles, notamment les temps de persistance, sont correctement capturées par le modèle, qui reproduit également la variabilité inter-individuelle. Cette étude permet de montrer qu'une collection de neurones dont l'activité est quasi-ponctuelle (de l'ordre de la dizaine de millisecondes) est capable de générer des signaux pouvant se maintenir dans un état sur des temps beaucoup plus long (de l'ordre de la dizaine de secondes) grâce à leurs connectivités, indiquant une propriété émergente du réseau. Cette propriété dote l'animal de la capacité d'intégrer un signal et d'en garder une représentation sur une période relativement longue, biaisant de fait son comportement futur et ouvrant la voie à des phénomènes de plasticité et de mémoire à court terme. Dans le cas de l'ARTR, cela permet à l'animal d'intégrer une stimulation lumineuse et de biaiser la direction de la nage vers la source [47, 135], ou d'éviter des stimulations nocives [107].

Le modèle permet une analyse approfondie de la dynamique du réseau. Par exemple, une simplification de la structure de ce dernier par une approche de champ moyen pourrait permettre d'expliquer la réponse de l'ARTR à différents types de stimulations, telle que la lumière ou la température. Comme mentionné plus tôt, il a été montré que la lumière biaise l'état du réseau [47], et on a vu dans ce manuscrit l'effet de la température sur les temps de persistance dans les états gauche et droite. L'étude en champ moyen –

en cours de finalisation au moment de l'écriture de ces lignes – permet de dresser le paysage énergétique du réseau et donc de quantifier la hauteur des barrières de potentiels régissant le passage d'un état à un autre. La modulation de ces barrières pourrait expliquer les modifications des fréquences de transition en fonction des stimulations extérieures. De plus, ces paysages pourraient également expliquer la variabilité d'essai en essai en fonction de l'état du système avant la stimulation et plus généralement la variabilité des dynamiques inter-individuelles.

Dans ce contexte d'activité spontanée, on s'est restreint à l'étude d'un unique circuit. Bien qu'il ait un rôle critique dans les processus d'exploration puisqu'impliqué dans la réorientation de l'animal, il a été hypothésé que l'ARTR est un circuit en aval de la structure sensorimotrice, assez proche des circuits moteurs [136, 135], suggérant que l'ARTR serait contrôlé par des circuits situés plus en amont. Il reste à déterminer si la température influe directement sur la dynamique de l'ARTR ou si les effets observés sont dus à une modification de la cascade neuromodulatrice. L'inférence de la matrice de connectivité peut permettre d'observer comment la température modifient ses poids et montrer si la modulation de la connectivité fonctionnelle du réseau est compatible avec les observations. Récemment, Kunst *et. al.* ont dressé un atlas de la connectivité structurelle, c'est à dire les véritables connections synaptiques entre neurones, d'une large fraction de neurones du cerveau de larve de poisson-zèbre [105]. L'utilisation de cet atlas pour identifier à quels autres neurones ou régions sont connectés les neurones de l'ARTR permettrait d'analyser directement l'activité de ces régions dans nos données en fonction de la température.

Le dispositif expérimental permettant l'enregistrement de l'activité neuronale d'un vertébré à l'échelle du cerveau entier à température donnée offre l'opportunité d'étudier d'autres circuits et régions qui seraient potentiellement modulés de la même façon que l'ARTR. Plus généralement, il est possible de caractériser l'effet de la température sur l'activité de certaines populations de neurones impliquées dans l'apprentissage et les prises de décision tel que le circuit habenula-raphe qui joue un rôle important dans les transitions d'un état du cerveau à un autre, qui se reflètent dans les états comportementaux [137, 109].

Enfin, la technique d'imagerie employée ici, la microscopie à nappe de lumière, offre également la possibilité unique d'étudier l'ensemble du cerveau *à la fois*, en prenant en compte l'activité simultanée de la cinquantaine de milliers de neurones enregistrés. Une telle analyse requiert de nouvelles méthodes numériques dont un exemple fait l'objet de l'annexe A.

Chapitre IV

Conclusion

IV.1 Résumé

Les animaux, en tant qu'individus mais aussi à l'échelle d'une population, s'adaptent constamment aux conditions extérieures pour survivre et se développer. Cette capacité d'adaptation est notamment médiée par une variabilité omniprésente, définissant un état interne propre à chacun et évoluant dans le temps. Comment ces états internes sont régulés et modulés par les informations extérieures reste une question ouverte.

Ici, on a utilisé la larve de poisson-zèbre pour étudier cette question. Cet animal modèle est un vertébré qui possèdent un riche répertoire comportemental et dont il est possible d'enregistrer une large partie de l'activité cérébrale. La température a été utilisée comme facteur extérieur, pour étudier son impact sur la dynamique interne de l'animal.

Dans un premier chapitre, la navigation d'une larve dans un gradient thermique a été analysée, montrant notamment que la larve se confine dans une plage de température de 22–28°C, échappant aux zones chaudes *et* froides. On a montré que les variations de température influent sur les paramètres cinématiques, la larve est ainsi capable d'intégrer l'information différentielle de température pour moduler le mouvement suivant. Des stimulations thermiques, sous forme de jets d'eau à température contrôlée, ont été imposées à une larve immobilisée sous un microscope à nappe de lumière permettant l'enregistrement de l'activité d'une large partie des neurones composant le cerveau. Cela a permis de dresser les cartes de réponses du cerveau à des stimulations chaudes et, pour la première fois, à des stimulations froides. Les régions impliquées dans la réponse au chaud et au froid sont différentes et distribuées à travers l'ensemble du cerveau.

Dans le second chapitre, on s'est concentré sur l'activité comportementale et cérébrale spontanée qui définissent l'état interne de l'animal. Ces états déterminent la façon dont l'animal répond à l'environnement extérieur et peuvent expliquer les différences observées

d'un animal à l'autre et au sein du même individu. On a montré comment la température de l'eau module l'exploration du répertoire comportemental de la larve, qui peut être réduit à un jeu minimal de cinq paramètres statistiquement couplés qui capturent la dynamique d'exploration. Ces paramètres et leurs interactions définissent un espace comportemental bien défini que l'animal explore sur une échelle de temps de l'ordre de la demi-heure. La température, plutôt que de changer les patrons de la navigation, contrôle l'occupation relative de l'espace comportemental en changeant la moyenne des distributions des paramètres sans en changer leur covariance.

L'enregistrement de l'activité endogénique d'un circuit neuronal, l'ARTR, sous-jacent à la réorientation de la larve, à différentes températures montrent une modulation de la dynamique cohérente avec le comportement observé. Un modèle d'Ising indépendant du temps inféré depuis les données a permis de reproduire la dynamique temporelle du circuit qui a la particularité de pouvoir maintenir son activité, fournissant à l'animal une représentation de l'information directionnelle sur des temps relativement long (de l'ordre de la dizaine de secondes) dans l'état gauche ou droite.

IV.2 Perspectives

Ce manuscrit propose une étude quantitative de l'effet de la température sur la locomotion et l'activité cérébrale de la larve de poisson-zèbre, dans un contexte où elle est directement stimulée mais aussi dans un contexte d'activité spontanée.

Une façon de traiter la complexité comportementale est proposée, spécifiquement, on a montré que la locomotion de cet animal peut être décrite à partir d'un jeu minimal de cinq paramètres et leurs relations. Les corrélations entre ces paramètres sont alors utilisées pour réduire à nouveau l'espace comportemental qui peut finalement être décrit par deux paramètres, nommément les deux premières composantes principales.

Ce cadre de travail permet l'étude statistique de l'évolution de l'état interne d'un individu. Cette description pourrait alors servir de base pour étudier les implications de ces états. Un dispositif expérimental en cours de développement au laboratoire, qui reproduit l'expérience décrite dans [114], consiste en un bassin virtuellement infini ($> 1m^2$) dans lequel une larve peut être suivie en temps réel par une caméra. En déterminant l'état interne du sujet selon la méthode proposée ici, on pourrait alors lui présenter une série de stimulations, visuelles par exemple, et déterminer les conséquences de son état sur sa réponse aux stimulations, tout en regardant comment ces dernières impactent à leur tour les paramètres comportementaux. On pourrait également imaginer être capable de déterminer un jeu de paramètres identifiant un individu à partir de sa nage. Cette identification pourrait permettre de prédire le type de réponse et quantifier alors la variabilité

inter-individuelle. Une approche similaire pourrait être employée sur les données neuronales pour identifier un individu grâce à une signature neuronale qui pourrait être définie grâce aux assemblées de neurones identifiées avec les machines de Boltzmann restreintes (RBM, voir annexe A). Ainsi, on pourrait estimer dans quelle mesure on peut prédire le type de comportement en fonction de l'activité neuronale, et aussi caractériser la réponse de certains circuits à des stimulations en fonction de l'état du cerveau.

L'approche déterministe souvent utilisée dans les études des effets d'une stimulation donnée sur un sujet consiste à observer un effet sur les sorties en fonction des entrées imposées au système. On a montré ici que les effets dus à la variabilité intra-individuelle sont parfois du même ordre de grandeur que l'effet de la stimulation, notamment dans les cas d'exploration spontanée biaisée vers un but. En effet, la lente exploration de l'espace comportemental provoque une forte variabilité d'un individu à l'autre, qui ont alors peu de chance de se trouver dans la même gamme d'état au même instant. Une expérience réalisée sur deux lots différents mais dans exactement les mêmes conditions n'excluent pas que les résultats soient différents, compliquant leur interprétation, surtout dans le cas d'expérience ayant une durée similaire au temps caractéristique de la modulation interne. Dans ce cas-là, le régime stationnaire n'est en fait jamais atteint et il subsistera toujours un biais. La modulation que l'on a observé suggère un continuum d'état interne plutôt qu'un espace discret où l'animal passe d'un état bien défini à un autre, rajoutant une couche de complexité au traitement de cette variabilité. Une approche statistique plutôt que déterministe est alors plus appropriée et on a montré que le sujet utilisé ici, la larve de poisson-zèbre, couplé à la température, est un bon modèle pour se prêter à cet exercice. De manière similaire, le modèle d'Ising décrit plus tôt suit la même logique : plutôt que d'inférer un ensemble de paramètres permettant de prédire la réaction d'un circuit à une stimulation, le modèle s'attelle à reproduire les *statistiques* des signaux mesurés.

Cette thèse a été l'occasion de construire un module de stimulation thermique compatible avec l'imagerie calcique fonctionnelle du cerveau entier. Les cartes de réponse au chaud et au froid ont été établies pour une large partie du cerveau. Ces cartes gagneraient à être étendues à l'ensemble du cerveau, en particulier les parties les plus ventrales qui n'ont pas été imagées ici. En effet, c'est dans ces régions que l'on trouve par exemple le raphe qui joue un rôle important dans les états du cerveaux puisqu'impliqué dans les phénomènes d'attente, d'apprentissage et de nociception [138, 139, 140, 141, 109] ainsi que des circuits de l'hypothalamus, impliqué dans la faim et la satiété [112]. Enfin, si la machinerie neuronale déterminant le ressenti du chaud a été examiné en détail [75], une approche similaire pourrait être utilisée pour établir celle du ressenti du froid.

Ce dispositif expérimental peut également être couplé aux machines de Boltzmann qui permettent d'inférer les assemblées de neurones. Un protocole avec une longue période

(30min) d'activité spontanée précédant une série de stimulations permettrait d'entraîner ces machines, extraire les assemblées et regarder comment elles se comportent vis à vis des stimulations, permettant une autre approche de la caractérisation de la réaction au chaud et au froid à l'échelle de tout le cerveau. Enfin, la température s'ajoute aux diverses modalités sensorielles étudiées au laboratoire Jean Perrin, au côté de la lumière [47], des composés chimiques [142] et de la stimulation vestibulaire [12]. L'examen croisé de toutes ces données permettrait de poser une base solide pour l'étude de l'intégration multisensorielle.

Annexe A

Modélisation de l'activité spontanée du cerveau entier

L'imagerie calcique par microscopie à nappe laser sur la larve de poisson-zèbre permet l'enregistrement de l'activité neuronale à l'échelle du cerveau entier. Pourtant, dans le cadre de l'activité spontanée, on ne s'est concentré dans la section III.2 que sur un petit circuit d'une centaine de neurones. *Quid* du reste du cerveau ? Certain · e · s pourraient alors s'interroger sur l'intérêt de l'enregistrement de la totalité du cerveau quand un microscope confocal classique suffirait pour étudier un seul circuit. Comme mentionné précédemment, l'étude de l'activité spontanée de plusieurs dizaines de milliers de neurones est complexe et requiert de nouvelles méthodes permettant la représentation et l'exploitation de ce volume de données.

Les données acquises durant mon projet de thèse ont ainsi pu être exploitées dans le cadre d'une colaboration avec Thijs van der Plas (Department of Physiology, Anatomy and Genetics, University of Oxford, UK), Jérôme Tubiana (Blavatnik School of Computer Science, Israel), Volker Bormuth (Laboratoire Jean Perrin) et Bernhard Englitz (Computational Neuroscience Lab, Donders Center for Neuroscience, Pays-Bas) qui a donné lieu à un article en cours de rédaction, intitulé *A maximum entropy graphical model unveils brain-wide neural assembly organization in Zebrafish* [143], très brièvement résumé ci-dessous.

Les corrélations observées entre neurones individuels à travers l'ensemble du cerveau ont mené à l'établissement d'une théorie proposant l'existence d'une organisation en *assemblées* [144, 145], dont les dynamiques permettent une représentation neuronale des signaux externes et de la maintenir même lorsque le signal s'interrompt. Ces groupes de neurones ont déjà été observés dans un certain nombre de systèmes (voir par exemple [146, 147, 148, 149, 150]), mais seulement dans des parties anatomiques relativement res-

treintes du cerveau (rétine, cortex, hippocampe, ...). Extraire l'organisation en assemblée du cerveau entier se heurte à deux problèmes : disposer de l'activité de tous les neurones (ou au moins une large fraction) enregistrés simultanément et développer un modèle permettant d'en extraire des assemblées, ayant un sens physiologique. On a montré tout au long de ce manuscrit que le premier problème a été résolu. Les auteurs montrent ici qu'un modèle, basé sur les machines de Boltzmann restreintes (RBM), permet de surmonter le deuxième.

À l'instar du modèle d'Ising décrit plus tôt, les RBM font partie des modèles à entropie maximale. Le principe est essentiellement le même : après avoir établi l'hamiltonien du système, définissant son énergie, la probabilité d'observer une configuration donnée est ensuite donnée par la distribution de Boltzmann. Un algorithme, développé par les auteurs et optimisé pour l'occasion, permet d'inférer les paramètres depuis les données.

Ici, plutôt que d'exprimer les corrélations de paires explicitement dans l'hamiltonien, une "couche" supplémentaire est introduite. Les "unités cachées" la composant (*hidden units*, HU) ne sont pas connectées entre elles, mais le sont aux neurones, eux mêmes n'étant pas connectés les uns aux autres, formant un graphe bipartite (figure A.1A, milieu). L'énergie s'exprime alors ainsi :

$$E(\boldsymbol{v}, \boldsymbol{h}) = -\sum_i g_i v_i + \sum_\mu \mathcal{U}_\mu(h_\mu) - \sum_{i,\mu} w_{i,\mu} v_i h_\mu$$

avec :

- $\boldsymbol{v}$: les neurones (unités visibles),
- $\boldsymbol{h}$: les unités cachées (HU),
- g_i : champ du au neurone i,
- $\mathcal{U}_\mu$: potentiel lié à l'unité cachée μ,
- $w_{i,\mu}$ connexion entre le neurone i et l'unité cachée μ.

La distribution de probabilités jointe d'observer une configuration $(\boldsymbol{v}, \boldsymbol{h})$ est alors donnée par :

$$P(\boldsymbol{v}, \boldsymbol{h}) = \frac{1}{Z} \exp\left(-E(\boldsymbol{v}, \boldsymbol{h})\right)$$

avec Z une constante de normalisation. Plusieurs méthodes, non détaillées ici, permettent de trouver l'ensemble de ces paramètres pour capturer au mieux les caractéristiques statistiques (activités moyennes des neurones, des unités cachées et leurs interactions). De la même façon que le modèle d'Ising, les RBM permettent de générer de nouvelles données, synthétiques, par échantillonnement Monte Carlo, ce qui permet de comparer les statistiques mesurées dans les données réelles et celles issues du modèle. Par construction, les caractéristiques sur lesquelles le modèle est explicitement entraîné sont bien reproduites, tandis que le modèle permet également de capturer les corrélations de paires entre neurones, démontrant le bien fondé de l'hypothèse que les interactions entre neurones peuvent

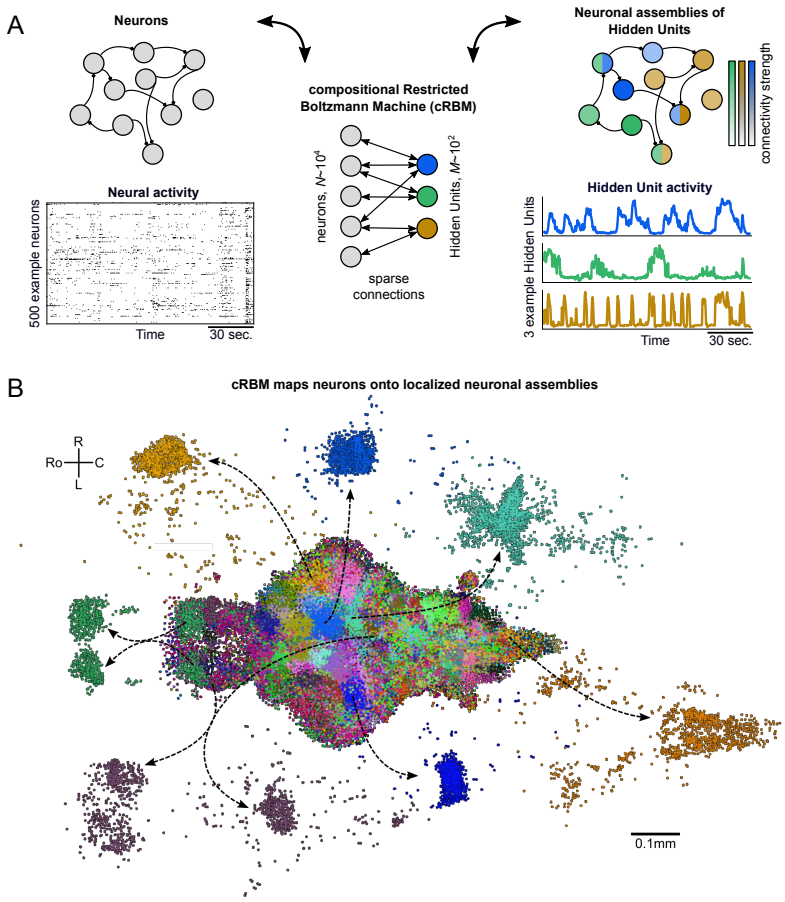


Fig. A.1 *Les cRBM groupent les neurones en assemblées.* ***A*** *Connexion des neurones (gauche) aux unités cachées (droite).* ***B*** *Exemple d'assemblées issues d'un poisson. Les neurones sont colorés selon leur plus forte connexion à une unité cachée. Tiré de [143].*

être expliqué par les interactions des assemblées auxquelles ils appartiennent et que les RBM représentent une technique de réduction de dimensionnalité permettant d'étudier les corrélations d'un grand nombres de neurones, autrement computationnellement trop lourd.

Une assemblée est définie comme un groupe de neurones dont la connexion la plus forte ($|w_{i,\mu}| \gg 0$) pointe vers la même unité cachée. Les assemblées issues d'un poisson pris à titre d'exemple sont montrées dans la figure A.1B, où la couleur associée à chaque neurone dépend de leur plus forte connexion à une unité cachée. Les assemblées semblent regrouper des neurones anatomiquement proches, alors que le modèle n'a aucune restriction spatiale. De plus, ces assemblées sont présentes à travers l'ensemble du cerveau.

L'examen plus détaillé des assemblées révèle que bon nombre d'entre elles correspondent à des circuits neurophysiologiques déjà identifiés par d'autres moyens, par exemple l'ARTR ou des circuits impliqués dans le système vestibulaire (figure A.2A-B).

Pour comparer cette méthode à une autre technique de réduction de dimensionnalité telle que la PCA, la matrice de connectivité W (contenant les poids des connexions $w_{i,\nu}$) est confrontée aux axes principaux issus de la PCA qui peuvent être également considérés comme des assemblées. La première est dite creuse (*sparse*), c'est à dire qu'une assemblée donnée est connectée à peu de régions anatomiques tandis qu'au contraire, dans la PCA, les assemblées sont largement connectées à travers le cerveau, sans pertinence anatomique. Cela fait de la RBM un modèle lisible et interprétable.

Le modèle permet également de déduire la connectivité fonctionnelle entre tous les neurones pour chaque poisson. Pour les comparer entre elles, les neurones sont regroupés par région anatomique définie par l'atlas mapzebrain [105], qui a l'avantage de disposer de la connectivité *structurelle* entre ces régions. Les connectivités fonctionnelles de chaque animal sont fortement corrélées (A.2E), montrant la robustesse du modèle et suggérant une organisation standard des assemblées ayant un sens physiologique. Une matrice moyenne de connectivité fonctionnelle est ensuite calculée (figure A.2C) et comparée à la connectivité structurelle de M. Kunst *et. al.* (A.2D). Les deux matrices sont visuellement très ressemblantes, ce qui est confirmée par la corrélation de Spearman entre les deux $r_S = 0.39$ (figure A.2F), un résultat plus élevé que d'autres méthodes d'extraction de connectivité fonctionnelle (covariance ou corrélation). Cela montre que les RBM peuvent potentiellement être utilisées pour inférer la connectivité physiologique uniquement à partir de données fonctionnelles.

Finalement, les auteurs ont mis au point un modèle, qui, pour les paraphraser, permet d'extraire des assemblées et leurs interactions avec les neurones, de reconstruire des données synthétiques dont les statistiques reproduisent celles observées dans les données (notamment les corrélations de paires) et qui conduit à une organisation hautement interprétable physiologiquement, seulement à partir des statistiques des données sans *a priori* sur la structure anatomique. Enfin, les RBM permettent l'étude des connectivités de l'ensemble du cerveau, computationnellement impossible pour un modèle d'Ising classique qui n'est limité qu'à une centaines de neurones.

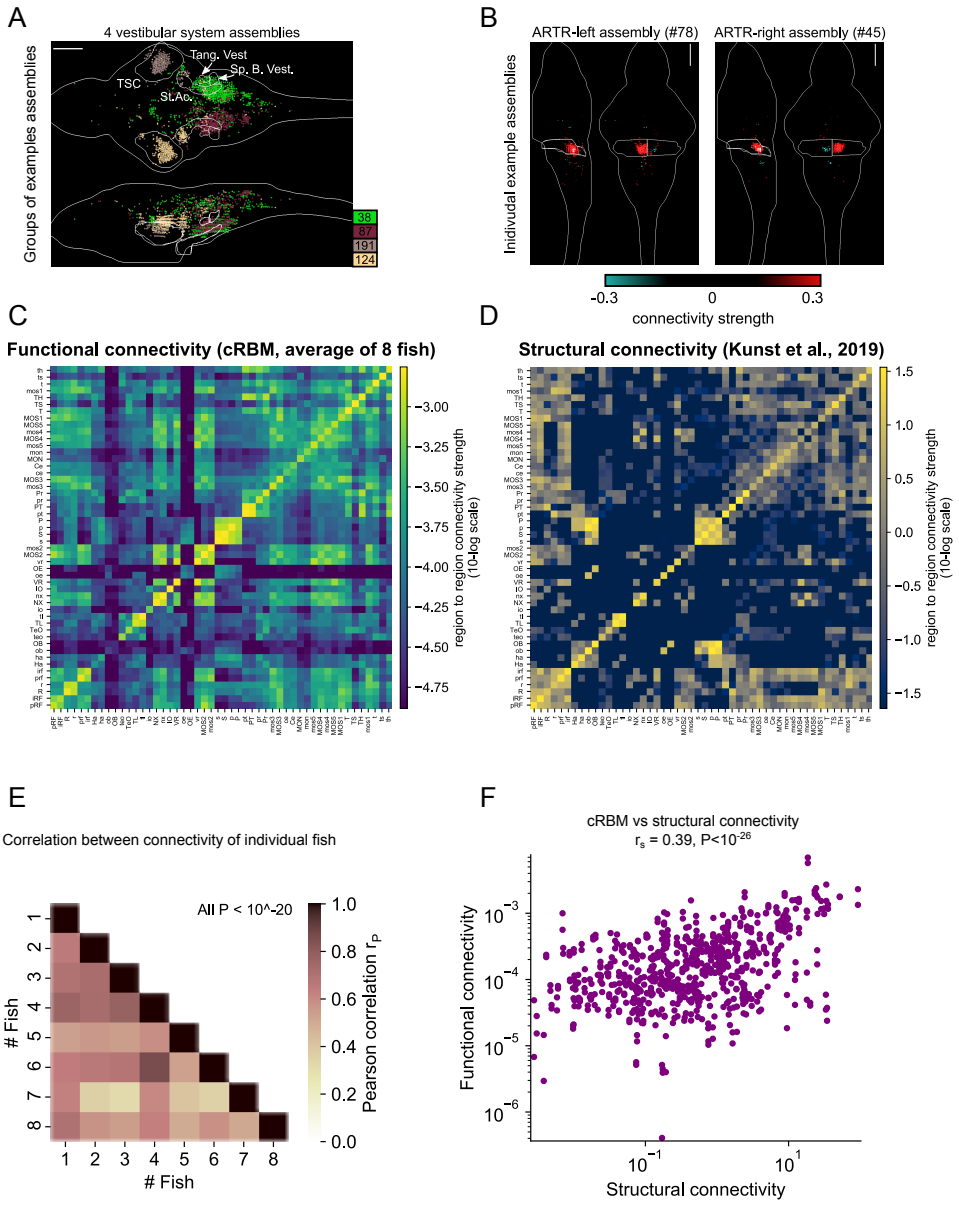


Fig. A.2 *Exploitation de la machine de Boltzmann restreinte.* ***A-B*** *Exemples d'assemblées correspondants à des circuits vestibulaires (****A****) et à l'ARTR (****B****).* ***C*** *Matrice de connectivité fonctionnelle moyenne inférée grâce aux RBM. Les régions correspondent aux régions de l'atlas mapzebrain.* ***D*** *Matrice de connectivité structurelle [105].* ***E*** *Corrélations entre connectivités fonctionnelles de chaque poisson individuel.* ***F*** *Relation entre connectivité structurelle et fonctionnelle. Tiré de [143].*

Bibliographie

[1] H. C. Berg & D. A. Brown ; «Chemotaxis in Escherichia Coli Analysed by Three-Dimensional Tracking» ; Nature (1972). 1

[2] T. Philippi & J. Seger ; «Hedging One's Evolutionary Bets, Revisited» ; Trends in Ecology & Evolution **4**, p. 41–44 (1989). ISSN 0169-5347. 2

[3] D. A. McCormick, D. B. Nestvogel & B. J. He ; «Neuromodulation of Brain State and Behavior» ; Annual Review of Neuroscience **43**, p. 391–415 (2020). ISSN 0147-006X, 1545-4126. 2, 69

[4] M. Scanziani & M. Häusser ; «Electrophysiology in the Age of Light» ; Nature **461**, p. 930–939 (2009). ISSN 0028-0836, 1476-4687. 3

[5] A. Coenen, E. Fine & O. Zayachkivska ; «Adolf Beck : A Forgotten Pioneer in Electroencephalography» ; Journal of the History of the Neurosciences **23**, p. 276–286 (2014). ISSN 0964-704X, 1744-5213. 3

[6] S. A. Huettel, A. W. Song & G. McCarthy ; *Functional Magnetic Resonance Imaging* ; 2e édition (Sinauer Associates, Sunderland, Mass) (2008) ; ISBN 978-0-87893-286-3. 3

[7] R. Y. Tsien ; «New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons : Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures» ; Biochemistry **19**, p. 2396–2404 (1980). ISSN 0006-2960, 1520-4995. 3

[8] T.-W. Chen, T. J. Wardill, Y. Sun, S. R. Pulver, S. L. Renninger, A. Baohan, E. R. Schreiter, R. A. Kerr, M. B. Orger, V. Jayaraman, L. L. Looger, K. Svoboda & D. S. Kim ; «Ultrasensitive Fluorescent Proteins for Imaging Neuronal Activity» ; Nature **499**, p. 295–300 (2013). ISSN 0028-0836, 1476-4687. 3, 4

[9] J. Tubiana, S. Wolf, T. Panier & G. Debregeas ; «Blind Deconvolution for Spike Inference from Fluorescence Recordings» ; Journal of Neuroscience Methods **342**, p. 108 763 (2020). ISSN 01650270. 4, 53, 58

[10] H. Dana, Y. Sun, B. Mohar, B. K. Hulse, A. M. Kerlin, J. P. Hasseman, G. Tsegaye, A. Tsang, A. Wong, R. Patel, J. J. Macklin, Y. Chen, A. Konnerth, V. Jayaraman, L. L. Looger, E. R. Schreiter, K. Svoboda & D. S. Kim ; «High-Performance Calcium Sensors for Imaging Activity in Neuronal Populations and Microcompartments» ; Nature Methods **16**, p. 649–657 (2019). ISSN 1548-7091, 1548-7105. 4

[11] M. Lovett-Barron, A. S. Andalman, W. E. Allen, S. Vesuna, I. Kauvar, V. M. Burns & K. Deisseroth ; «Ancestral Circuits for the Coordinated Modulation of Brain State» ; Cell **171**, p. 1411–1423.e17 (2017). ISSN 00928674. 4

[12] G. Migault, T. L. van der Plas, H. Trentesaux, T. Panier, R. Candelier, R. Proville, B. Englitz, G. Debrégeas & V. Bormuth ; «Whole-Brain Calcium Imaging during Physiological Vestibular Stimulation in Larval Zebrafish» ; Current Biology **28**, p. 3723–3735.e6 (2018). ISSN 09609822. 4, 114

[13] H. Trentesaux ; *Microscope à nappe laser deux photons rotatif pour l'étude de l'intégration multisensorielle chez la larve de poisson zèbre* ; Thèse de doctorat ; Sorbonne Université ; Laboratoire Jean Perrin (2021). 6

[14] G. M. Shepherd ; *Foundations of the Neuron Doctrine* (Oxford University Press) (2016) ; ISBN 978-0-19-025938-9. 5

[15] R. Yuste ; «From the Neuron Doctrine to Neural Networks» ; Nature Reviews Neuroscience **16**, p. 487–497 (2015). ISSN 1471-003X, 1471-0048. 5

[16] S. Herculano-Houzel, K. Avelino-de-Souza, K. Neves, J. PorfÃrio, D. Messeder, L. Mattos FeijÃ^3, J. Maldonado & P. R. Manger ; «The Elephant Brain in Numbers» ; Frontiers in Neuroanatomy **8** (2014). ISSN 1662-5129. 5

[17] S. Herculano-Houzel, B. Mota & R. Lent ; «Cellular Scaling Rules for Rodent Brains» ; Proceedings of the National Academy of Sciences **103**, p. 12 138–12 143 (2006). ISSN 0027-8424, 1091-6490. 6

[18] F. Hamilton ; *An Account of the Fishes Found in the River Ganges and Its Branches* (Archibald Constable and Company) (1822). 6

[19] R. Spence, G. Gerlach, C. Lawrence & C. Smith ; «The Behaviour and Ecology of the Zebrafish, Danio Rerio» ; Biological Reviews **83**, p. 13–34 (2007). ISSN 14647931. 6, 7

[20] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann & T. F. Schilling ; «Stages of Embryonic Development of the Zebrafish» ; Developmental Dynamics **203**, p. 253–310 (1995). ISSN 10588388. 7

[21] K. Howe, M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J. C. Barrett, R. Koch, G.-J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L. T. Quintais, J. A. Guerra-Assunção, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J.-H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S. F. Maguire, G. K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliott, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, S. Begum, B. Mortimore, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Lloyd, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthravadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, J. Brown, C. Murnane, E. Gray, M. Humphries, N. Sycamore, D. Barker, D. Saunders, J. Wallis, A. Babbage, S. Hammond, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Barr, S. Martin, P. Wray, A. Ellington, N. Matthews, M. Ellwood, R. Woodmansey, G. Clark, J. D. Cooper, A. Tromans, D. Grafham, C. Skuce, R. Pandian, R. Andrews, E. Harrison, A. Kimberley, J. Garnett, N. Fosker, R. Hall, P. Garner, D. Kelly, C. Bird, S. Palmer, I. Gehring, A. Berger, C. M. Dooley, Z. Ersan-Ürün, C. Eser, H. Geiger, M. Geisler, L. Karotki, A. Kirn, J. Konantz, M. Konantz, M. Oberländer, S. Rudolph-Geiger, M. Teucke, C. Lanz, G. Raddatz, K. Osoegawa, B. Zhu, A. Rapp, S. Widaa, C. Langford, F. Yang, S. C. Schuster, N. P. Carter, J. Harrow, Z. Ning, J. Herrero, S. M. J. Searle, A. Enright, R. Geisler, R. H. A. Plasterk, C. Lee, M. Westerfield, P. J. de Jong, L. I. Zon, J. H. Postlethwait, C. Nüsslein-Volhard, T. J. P. Hubbard, H. R. Crollius, J. Rogers & D. L. Stemple ; «The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome» ; Nature **496**, p. 498–503 (2013). ISSN 0028-0836, 1476-4687. 7

[22] A. B. Butler & W. Hodos ; *Comparative Vertebrate Neuroanatomy : Evolution and Adaptation* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA) (2005) ; ISBN 978-0-471-73384-3 978-0-471-21005-4. 7

[23] F. Engert & S. Wilson ; «Zebrafish Neurobiology : From Development to Circuit Function and Behaviour» ; Developmental Neurobiology **72**, p. 215–217 (2011). ISSN 19328451. 7

[24] P. S. Katz ; «The Conservative Bias of Life Scientists» ; Current Biology **29**, p. R666–R667 (2019). ISSN 09609822. 7

[25] A. Sakurai & P. S. Katz ; «Command or Obey ? Homologous Neurons Differ in Hierarchical Position for the Generation of Homologous Behaviors» ; The Journal of Neuroscience **39**, p. 6460–6471 (2019). ISSN 0270-6474, 1529-2401. 7

[26] J. Lister, C. Robertson, T. Lepage, S. Johnson & D. Raible ; «Nacre Encodes a Zebrafish Microphthalmia-Related Protein That Regulates Neural-Crest-Derived Pigment Cell Fate» ; Development **126**, p. 3757–3767 (1999). ISSN 1477-9129, 0950-1991. 7

[27] M. B. Ahrens, J. M. Li, M. B. Orger, D. N. Robson, A. F. Schier, F. Engert & R. Portugues ; «Brain-Wide Neuronal Dynamics during Motor Adaptation in Zebrafish» ; Nature **485**, p. 471–477 (2012). ISSN 0028-0836, 1476-4687. 7, 93

[28] N. Vladimirov, Y. Mu, T. Kawashima, D. V. Bennett, C.-T. Yang, L. L. Looger, P. J. Keller, J. Freeman & M. B. Ahrens ; «Light-Sheet Functional Imaging in Fictively Behaving Zebrafish» ; Nature Methods **11**, p. 883–884 (2014). ISSN 1548-7091, 1548-7105. 7

[29] S. Quirin, N. Vladimirov, C.-T. Yang, D. S. Peterka, R. Yuste & M. B. Ahrens ; «Calcium Imaging of Neural Circuits with Extended Depth-of-Field Light-Sheet Microscopy» ; Optics Letters **41**, p. 855 (2016). ISSN 0146-9592, 1539-4794. 7

[30] O. Randlett, C. L. Wee, E. A. Naumann, O. Nnaemeka, D. Schoppik, J. E. Fitzgerald, R. Portugues, A. M. B. Lacoste, C. Riegler, F. Engert & A. F. Schier ; «Whole-Brain Activity Mapping onto a Zebrafish Brain Atlas» ; Nature Methods **12**, p. 1039–1046 (2015). ISSN 1548-7091, 1548-7105. 9, 54

[31] R. Portugues, K. E. Severi, C. Wyart & M. B. Ahrens ; «Optogenetics in a Transparent Animal : Circuit Function in the Larval Zebrafish» ; Current Opinion in Neurobiology **23**, p. 119–126 (2012). ISSN 09594388. 8

[32] T. Roeser & H. Baier ; «Visuomotor Behaviors in Larval Zebrafish after GFP-Guided Laser Ablation of the Optic Tectum» ; The Journal of Neuroscience **23**, p. 3726–3734 (2003). ISSN 0270-6474, 1529-2401. 8

[33] G. Nagel ; «Channelrhodopsin-1 : A Light-Gated Proton Channel in Green Algae» ; Science **296**, p. 2395–2398 (2002). ISSN 00368075, 10959203. 8

[34] K. Deisseroth, G. Feng, A. K. Majewska, G. Miesenbock, A. Ting & M. J. Schnitzer ; «Next-Generation Optical Technologies for Illuminating Genetically Targeted Brain Circuits» ; Journal of Neuroscience **26**, p. 10 380–10 386 (2006). ISSN 0270-6474, 1529-2401. 8

[35] J. W. Krakauer, A. A. Ghazanfar, A. Gomez-Marin, M. A. MacIver & D. Poeppel ; «Neuroscience Needs Behavior : Correcting a Reductionist Bias» ; Neuron **93**, p. 480–490 (2017). ISSN 08966273. 8

[36] M. B. Orger, M. C. Smear, S. M. Anstis & H. Baier ; «Perception of Fourier and Non-Fourier Motion by Larval Zebrafish» ; Nature Neuroscience **3**, p. 1128–1133 (2000). ISSN 1097-6256, 1546-1726. 8

[37] M. B. Orger, A. R. Kampff, K. E. Severi, J. H. Bollmann & F. Engert ; «Control of Visually Guided Behavior by Distinct Populations of Spinal Projection Neurons» ; Nature Neuroscience **11**, p. 327–333 (2008). ISSN 1097-6256, 1546-1726. 8

[38] O. Rinner, J. M. Rick & S. C. F. Neuhauss ; «Contrast Sensitivity, Spatial and Temporal Tuning of the Larval Zebrafish Optokinetic Response» ; Investigative Opthalmology & Visual Science **46**, p. 137 (2005). ISSN 1552-5783. 8

[39] W. Mo, F. Chen, A. Nechiporuk & T. Nicolson ; «Quantification of Vestibular-Induced Eye Movements in Zebrafish Larvae» ; BMC Neuroscience **11**, p. 110 (2010). ISSN 1471-2202. 8

[40] I. H. Bianco, L.-H. Ma, D. Schoppik, D. N. Robson, M. B. Orger, J. C. Beck, J. M. Li, A. F. Schier, F. Engert & R. Baker ; «The Tangential Nucleus Controls a Gravito-Inertial Vestibulo-Ocular Reflex» ; Current Biology **22**, p. 1285–1295 (2012). ISSN 09609822. 8

[41] D. E. Ehrlich & D. Schoppik ; «Control of Movement Initiation Underlies the Development of Balance» ; Current Biology **27**, p. 334–344 (2017). ISSN 09609822. 8

[42] T. W. Dunn, C. Gebhardt, E. A. Naumann, C. Riegler, M. B. Ahrens, F. Engert & F. Del Bene ; «Neural Circuits Underlying Visually Evoked Escapes in Larval Zebrafish» ; Neuron **89**, p. 613–628 (2016). ISSN 08966273. 8

[43] H. A. Burgess & M. Granato ; «Modulation of Locomotor Activity in Larval Zebrafish during Light Adaptation» ; Journal of Experimental Biology **210**, p. 2526–2539 (2007). ISSN 0022-0949, 1477-9145. 8

[44] H. A. Burgess, H. Schoch & M. Granato ; «Distinct Retinal Pathways Drive Spatial Orientation Behaviors in Zebrafish Navigation» ; Current Biology **20**, p. 381–386 (2010). ISSN 09609822. 8, 11, 28

[45] X. Chen & F. Engert ; «Navigational Strategies Underlying Phototaxis in Larval Zebrafish» ; Frontiers in Systems Neuroscience **8** (2014). ISSN 1662-5137. 8, 11

[46] T. W. Dunn, Y. Mu, S. Narayan, O. Randlett, E. A. Naumann, C.-T. Yang, A. F. Schier, J. Freeman, F. Engert & M. B. Ahrens ; «Brain-Wide Mapping of Neural Activity Controlling Zebrafish Exploratory Locomotion» ; eLife **5**, p. e12 741 (2016). ISSN 2050-084X. 8, 92, 93, 94

[47] S. Wolf, A. M. Dubreuil, T. Bertoni, U. L. Böhm, V. Bormuth, R. Candelier, S. Karpenko, D. G. C. Hildebrand, I. H. Bianco, R. Monasson & G. Debrégeas ; «Sensorimotor Computation Underlying Phototaxis in Zebrafish» ; Nature Communications **8**, p. 651 (2017). ISSN 2041-1723. 8, 92, 93, 94, 108, 114

[48] S. Karpenko, S. Wolf, J. Lafaye, G. Le Goc, T. Panier, V. Bormuth, R. Candelier & G. Debrégeas ; «From Behavior to Circuit Modeling of Light-Seeking Navigation in Zebrafish Larvae» ; eLife **9**, p. e52 882 (2020). ISSN 2050-084X. 8, 11, 40, 70, 71, 93

[49] D. N. Robson ; *Thermal Navigation in Larval Zebrafish* ; Thèse de doctorat ; Harvard University (2013). 9, 12, 14, 28

[50] M. Haesemeyer, D. N. Robson, J. M. Li, A. F. Schier & F. Engert ; «The Structure and Timescales of Heat Perception in Larval Zebrafish» ; Cell Systems **1**, p. 338–348 (2015). ISSN 24054712. 9, 13, 15

[51] F. Kermen, L. Darnet, C. Wiest, F. Palumbo, J. Bechert, O. Uslu & E. Yaksi ; «Stimulus-Specific Behavioral Responses of Zebrafish to a Large Range of Odors Exhibit Individual Variability» ; BMC Biology **18**, p. 66 (2020). ISSN 1741-7007. 9

[52] B. Gallois ; *Assessing chemical perception of the young zebrafish* ; Thèse de doctorat ; Sorbonne Université ; Laboratoire Jean Perrin (2021). 9

[53] A. Suli, G. M. Watson, E. W. Rubel & D. W. Raible ; «Rheotaxis in Larval Zebrafish Is Mediated by Lateral Line Mechanosensory Hair Cells» ; PLoS ONE **7**, p. e29 727 (2012). ISSN 1932-6203. 9

[54] J. Olszewski, M. Haehnel, M. Taguchi & J. C. Liao ; «Zebrafish Larvae Exhibit Rheotaxis and Can Escape a Continuous Suction Source Using Their Lateral Line» ; PLoS ONE **7**, p. e36 661 (2012). ISSN 1932-6203. 9

[55] R. Olive, S. Wolf, A. Dubreuil, V. Bormuth, G. Debrégeas & R. Candelier ; «Rheotaxis of Larval Zebrafish : Behavioral Study of a Multi-Sensory Process» ; Frontiers in Systems Neuroscience **10** (2016). ISSN 1662-5137. 9

[56] P. Oteiza, I. Odstrcil, G. Lauder, R. Portugues & F. Engert ; «A Novel Mechanism for Mechanosensory-Based Rheotaxis in Larval Zebrafish» ; Nature **547**, p. 445–448 (2017). ISSN 0028-0836, 1476-4687. 9

[57] S. Budick & D. O'Malley ; «Locomotor Repertoire of the Larval Zebrafish : Swimming, Turning and Prey Capture» ; Journal of Experimental Biology **203**, p. 2565–2579 (2000). ISSN 1477-9145, 0022-0949. 9, 25

[58] I. H. Bianco, A. R. Kampff & F. Engert ; «Prey Capture Behavior Evoked by Simple Visual Stimuli in Larval Zebrafish» ; Frontiers in Systems Neuroscience **5** (2011). ISSN 1662-5137. 9

[59] R. Harpaz & E. Schneidman ; «Social Interactions Drive Efficient Foraging and Income Equality in Groups of Fish» ; eLife **9**, p. e56 196 (2020). ISSN 2050-084X. 9

[60] K.-H. Huang, P. Rupprecht, T. Frank, K. Kawakami, T. Bouwmeester & R. W. Friedrich ; «A Virtual Reality System to Analyze Neural Activity and Behavior in Adult Zebrafish» ; Nature Methods **17**, p. 343–351 (2020). ISSN 1548-7091, 1548-7105. 9

[61] Y. Mu, S. Narayan, B. D. Mensh & M. B. Ahrens ; «Brain-Wide, Scale-Wide Physiology Underlying Behavioral Flexibility in Zebrafish» ; Current Opinion in Neurobiology **64**, p. 151–160 (2020). ISSN 09594388. 9

[62] K. E. Severi, R. Portugues, J. C. Marques, D. M. O'Malley, M. B. Orger & F. Engert ; «Neural Control and Modulation of Swimming Speed in the Larval Zebrafish» ; Neuron **83**, p. 692–707 (2014). ISSN 08966273. 10, 31, 39

[63] J. C. Marques, S. Lackner, R. Félix & M. B. Orger ; «Structure of the Zebrafish Locomotor Repertoire Revealed with Unsupervised Behavioral Clustering» ; Current Biology **28**, p. 181–195.e5 (2018). ISSN 09609822. 11

[64] S. Arrhenius ; «Über Die Dissociationswärme Und Den Einfluss Der Temperatur Auf Den Dissociationsgrad Der Elektrolyte» ; Zeitschrift für Physikalische Chemie **4U** (1889). ISSN 2196-7156, 0942-9352. 11

[65] N. J. Himmel & D. N. Cox ; «Transient Receptor Potential Channels : Current Perspectives on Evolution, Structure, Function and Nomenclature» ; Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **287**, p. 20201 309 (2020). ISSN 0962-8452, 1471-2954. 11

[66] A. Patapoutian, A. M. Peier, G. M. Story & V. Viswanath ; «ThermoTRP Channels and beyond : Mechanisms of Temperature Sensation» ; Nature Reviews Neuroscience **4**, p. 529–539 (2003). ISSN 1471-003X, 1471-0048. 11

[67] M. Rosenzweig, K. M. Brennan, T. D. Tayler, P. O. Phelps, A. Patapoutian & P. A. Garrity ; «The Drosophila Ortholog of Vertebrate TRPA1 Regulates Thermotaxis» ; Genes & Development **19**, p. 419–424 (2005). ISSN 0890-9369. 11

[68] A. M. Peier, A. Moqrich, A. C. Hergarden, A. J. Reeve, D. A. Andersson, G. M. Story, T. J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan & A. Patapoutian ; «A TRP Channel That Senses Cold Stimuli and Menthol» ; Cell **108**, p. 705–715 (2002). ISSN 00928674. 12

[69] D. A. Yarmolinsky, Y. Peng, L. A. Pogorzala, M. Rutlin, M. A. Hoon & C. S. Zuker ; «Coding and Plasticity in the Mammalian Thermosensory System» ; Neuron **92**, p. 1079–1092 (2016). ISSN 08966273. 12

[70] P. Gau, J. Poon, C. Ufret-Vincenty, C. D. Snelson, S. E. Gordon, D. W. Raible & A. Dhaka ; «The Zebrafish Ortholog of TRPV1 Is Required for Heat-Induced Locomotion» ; Journal of Neuroscience **33**, p. 5249–5260 (2013). ISSN 0270-6474, 1529-2401. 12, 13, 70

[71] D. A. Prober, S. Zimmerman, B. R. Myers, B. M. McDermott, S.-H. Kim, S. Caron, J. Rihel, L. Solnica-Krezel, D. Julius, A. J. Hudspeth & A. F. Schier ; «Zebrafish TRPA1 Channels Are Required for Chemosensation But Not for Thermosensation or Mechanosensory Hair Cell Function» ; Journal of Neuroscience **28**, p. 10 102–10 110 (2008). ISSN 0270-6474, 1529-2401. 12

[72] S. Saito & R. Shingai ; «Evolution of thermoTRP Ion Channel Homologs in Vertebrates» ; Physiological Genomics **27**, p. 219–230 (2006). ISSN 1094-8341, 1531-2267. 12

[73] M. Kasai, S. Hososhima & L. Yun-Fei ; «Menthol Induces Surgical Anesthesia and Rapid Movement in Fishes» ; The Open Neuroscience Journal **8**, p. 1–8 (2014). ISSN 18740820. 12

[74] P. A. Garrity, M. B. Goodman, A. D. Samuel & P. Sengupta ; «Running Hot and Cold : Behavioral Strategies, Neural Circuits, and the Molecular Machinery for Thermotaxis in C. Elegans and Drosophila» ; Genes & Development **24**, p. 2365–2382 (2010). ISSN 0890-9369. 13

[75] M. Haesemeyer, D. N. Robson, J. M. Li, A. F. Schier & F. Engert ; «A Brain-Wide Circuit Model of Heat-Evoked Swimming Behavior in Larval Zebrafish» ; Neuron **98**, p. 817–831.e6 (2018). ISSN 08966273. 16, 17, 60, 66, 113

[76] Y. A. Pan, M. Choy, D. A. Prober & A. F. Schier ; «Robo2 Determines Subtype-Specific Axonal Projections of Trigeminal Sensory Neurons» ; Development **139**, p. 591–600 (2012). ISSN 1477-9129, 0950-1991. 16

[77] P. P. Hernández, V. Moreno, F. A. Olivari & M. L. Allende ; «Sub-Lethal Concentrations of Waterborne Copper Are Toxic to Lateral Line Neuromasts in Zebrafish (Danio Rerio)» ; Hearing Research **213**, p. 1–10 (2006). ISSN 03785955. 19

[78] M. J. Zimmermann, N. E. Nevala, T. Yoshimatsu, D. Osorio, D.-E. Nilsson, P. Berens & T. Baden ; «Zebrafish Differentially Process Color across Visual Space to Match Natural Scenes» ; Current Biology **28**, p. 2018–2032.e5 (2018). ISSN 09609822. 19

[79] C. Buske & R. Gerlai ; «Shoaling Develops with Age in Zebrafish (Danio Rerio)» ; Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry **35**, p. 1409–1415 (2011). ISSN 02785846. 23

[80] E. Dreosti, G. Lopes, A. R. Kampff & S. W. Wilson ; «Development of Social Behavior in Young Zebrafish» ; Frontiers in Neural Circuits **9** (2015). ISSN 1662-5110. 23

[81] R. C. Hinz & G. G. de Polavieja ; «Ontogeny of Collective Behavior Reveals a Simple Attraction Rule» ; Proceedings of the National Academy of Sciences **114**, p. 2295–2300 (2017). ISSN 0027-8424, 1091-6490. 23

[82] J. López-Olmeda & F. Sánchez-Vázquez ; «Thermal Biology of Zebrafish (Danio Rerio)» ; Journal of Thermal Biology **36**, p. 91–104 (2011). ISSN 03064565. 24

[83] B. Gallois & R. Candelier ; «FastTrack : An Open-Source Software for Tracking Varying Numbers of Deformable Objects» ; PLOS Computational Biology **17**, p. e1008 697 (2021). ISSN 1553-7358. 25, 26

[84] G. Le Goc, J. Lafaye, S. Karpenko, V. Bormuth, R. Candelier & G. Debrégeas ; «Thermal Modulation of Zebrafish Exploratory Statistics Reveals Constraints on Individual Behavioral Variability» ; BMC Biology **19**, p. 208 (2021). 31, 69

[85] B. Hille ; *Ion Channels of Excitable Membranes* ; 3^{e} édition (Sinauer Associates) (2001) ; ISBN 978-0-87893-321-1. 39

[86] M. A. Long & M. S. Fee ; «Using Temperature to Analyse Temporal Dynamics in the Songbird Motor Pathway» ; Nature **456**, p. 189–194 (2008). ISSN 0028-0836, 1476-4687. 39

[87] L. S. Tang, M. L. Goeritz, J. S. Caplan, A. L. Taylor, M. Fisek & E. Marder ; «Precise Temperature Compensation of Phase in a Rhythmic Motor Pattern» ; PLoS Biology **8**, p. e1000 469 (2010). ISSN 1545-7885. 40

[88] L. S. Tang, A. L. Taylor, A. Rinberg & E. Marder ; «Robustness of a Rhythmic Circuit to Short- and Long-Term Temperature Changes» ; Journal of Neuroscience **32**, p. 10 075–10 085 (2012). ISSN 0270-6474, 1529-2401. 40

[89] A. Rinberg, A. L. Taylor & E. Marder ; «The Effects of Temperature on the Stability of a Neuronal Oscillator» ; PLOS Computational Biology **9**, p. e1002 857 (2013). ISSN 1553-7358. 40

[90] D. H. Kim, J. Kim, J. C. Marques, A. Grama, D. G. C. Hildebrand, W. Gu, J. M. Li & D. N. Robson ; «Pan-Neuronal Calcium Imaging with Cellular Resolution in Freely Swimming Zebrafish» ; Nature Methods **14**, p. 1107–1114 (2017). ISSN 1548-7091, 1548-7105. 41

[91] L. Cong, Z. Wang, Y. Chai, W. Hang, C. Shang, W. Yang, L. Bai, J. Du, K. Wang & Q. Wen ; «Rapid Whole Brain Imaging of Neural Activity in Freely Behaving Larval Zebrafish (Danio Rerio)» ; eLife **6**, p. e28 158 (2017). ISSN 2050-084X. 41

[92] A. H. Voie, D. H. Burns & F. A. Spelman ; «Orthogonal-Plane Fluorescence Optical Sectioning : Three-Dimensional Imaging of Macroscopic Biological Specimens» ; Journal of Microscopy **170**, p. 229–236 (1993). ISSN 00222720. 41

[93] J. Huisken ; «Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy» ; Science **305**, p. 1007–1009 (2004). ISSN 0036-8075, 1095-9203. 41

[94] T. F. Holekamp, D. Turaga & T. E. Holy ; «Fast Three-Dimensional Fluorescence Imaging of Activity in Neural Populations by Objective-Coupled Planar Illumination Microscopy» ; Neuron **57**, p. 661–672 (2008). ISSN 08966273. 41

[95] T. Panier, S. A. Romano, R. Olive, T. Pietri, G. Sumbre, R. Candelier & G. Debrégeas ; «Fast Functional Imaging of Multiple Brain Regions in Intact Zebrafish Larvae Using Selective Plane Illumination Microscopy» ; Frontiers in Neural Circuits **7** (2013). ISSN 1662-5110. 41, 42, 43

[96] M. B. Ahrens, M. B. Orger, D. N. Robson, J. M. Li & P. J. Keller ; «Whole-Brain Functional Imaging at Cellular Resolution Using Light-Sheet Microscopy» ; Nature Methods **10**, p. 413–420 (2013). ISSN 1548-7091, 1548-7105. 41, 92, 93

[97] G. Migault ; *Imagerie calcique à l'échelle du cerveau entier durant une stimulation vestibulaire chez la larve de poisson zèbre* ; Thèse de doctorat ; Sorbonne Université (2020). 42

[98] T. Panier ; *Imagerie par nappe laser de l'activité neuronale dans l'ensemble du cerveau d'un poisson-zèbre* ; Thèse de doctorat ; Université Pierre et Marie Curie ; Laboratoire Jean Perrin (2014). 42, 51

[99] R. Olive ; *Perception Des Écoulements et Des Vibrations Chez La Larve de Poisson-Zèbre : Étude Comportementale et Imagerie* ; Thèse de doctorat ; Université Pierre et Marie Curie ; Laboratoire Jean Perrin (2016). 46

[100] E. Yaksi & R. W. Friedrich ; «Reconstruction of Firing Rate Changes across Neuronal Populations by Temporally Deconvolved Ca2+ Imaging» ; Nature Methods **3**, p. 377–383 (2006). ISSN 1548-7091, 1548-7105. 53

[101] E. A. Pnevmatikakis, D. Soudry, Y. Gao, T. A. Machado, J. Merel, D. Pfau, T. Reardon, Y. Mu, C. Lacefield, W. Yang, M. Ahrens, R. Bruno, T. M. Jessell, D. S. Peterka, R. Yuste & L. Paninski ; «Simultaneous Denoising, Deconvolution, and Demixing of Calcium Imaging Data» ; Neuron **89**, p. 285–299 (2016). ISSN 08966273. 53

[102] J. Friedrich, P. Zhou & L. Paninski ; «Fast Online Deconvolution of Calcium Imaging Data» ; PLOS Computational Biology **13**, p. e1005 423 (2017). ISSN 1553-7358. 53

[103] G. D. Marquart, K. M. Tabor, M. Brown, J. L. Strykowski, G. K. Varshney, M. C. LaFave, T. Mueller, S. M. Burgess, S.-i. Higashijima & H. A. Burgess ; «A 3D Searchable Database of Transgenic Zebrafish Gal4 and Cre Lines for Functional Neuroanatomy Studies» ; Frontiers in Neural Circuits **9** (2015). ISSN 1662-5110. 54

[104] K. M. Tabor, G. D. Marquart, C. Hurt, T. S. Smith, A. K. Geoca, A. A. Bhandiwad, A. Subedi, J. L. Sinclair, H. M. Rose, N. F. Polys & H. A. Burgess ; «Brain-Wide Cellular Resolution Imaging of Cre Transgenic Zebrafish Lines for Functional Circuit-Mapping» ; eLife **8**, p. e42 687 (2019). ISSN 2050-084X. 54

[105] M. Kunst, E. Laurell, N. Mokayes, A. Kramer, F. Kubo, A. M. Fernandes, D. Förster, M. Dal Maschio & H. Baier ; «A Cellular-Resolution Atlas of the Larval Zebrafish Brain» ; Neuron **103**, p. 21–38.e5 (2019). ISSN 08966273. 54, 109, 118, 119

[106] A. Miri, K. Daie, R. D. Burdine, E. Aksay & D. W. Tank ; «Regression-Based Identification of Behavior-Encoding Neurons During Large-Scale Optical Imaging of Neural Activity at Cellular Resolution» ; Journal of Neurophysiology **105**, p. 964–980 (2011). ISSN 0022-3077, 1522-1598. 57, 58

[107] Q. Lin, J. Manley, M. Helmreich, F. Schlumm, J. M. Li, D. N. Robson, F. Engert, A. Schier, T. Nöbauer & A. Vaziri ; «Cerebellar Neurodynamics Predict Decision Timing and Outcome on the Single-Trial Level» ; Cell **180**, p. 536–551.e17 (2020). ISSN 00928674. 60, 93, 108

[108] E. R. Duboué, E. Hong, K. C. Eldred & M. E. Halpern ; «Left Habenular Activity Attenuates Fear Responses in Larval Zebrafish» ; Current Biology **27**, p. 2154–2162.e3 (2017). ISSN 09609822. 62

[109] A. S. Andalman, V. M. Burns, M. Lovett-Barron, M. Broxton, B. Poole, S. J. Yang, L. Grosenick, T. N. Lerner, R. Chen, T. Benster, P. Mourrain, M. Levoy, K. Rajan & K. Deisseroth ; «Neuronal Dynamics Regulating Brain and Behavioral State Transitions» ; Cell **177**, p. 970–985.e20 (2019). ISSN 00928674. 62, 91, 109, 113

[110] B.-W. Cherng, T. Islam, M. Torigoe, T. Tsuboi & H. Okamoto ; «The Dorsal Lateral Habenula-Interpeduncular Nucleus Pathway Is Essential for Left-Right-Dependent Decision Making in Zebrafish» ; Cell Reports **32**, p. 108 143 (2020). ISSN 22111247. 62

[111] A. Messina, D. Potrich, I. Schiona, V. A. Sovrano, S. E. Fraser, C. H. Brennan & G. Vallortigara ; «Neurons in the Dorso-Central Division of Zebrafish Pallium Respond to Change in Visual Numerosity» ; Preprint ; Neuroscience (2020). 62

[112] A. Filosa, A. J. Barker, M. Dal Maschio & H. Baier ; «Feeding State Modulates Behavioral Choice and Processing of Prey Stimuli in the Zebrafish Tectum» ; Neuron **90**, p. 596–608 (2016). ISSN 08966273. 91, 113

[113] C. L. Wee, E. Y. Song, R. E. Johnson, D. Ailani, O. Randlett, J.-Y. Kim, M. Nikitchenko, A. Bahl, C.-T. Yang, M. B. Ahrens, K. Kawakami, F. Engert & S. Kunes ; «A Bidirectional Network for Appetite Control in Larval Zebrafish» ; eLife p. 37 (2019). 91

[114] R. E. Johnson, S. Linderman, T. Panier, C. L. Wee, E. Song, K. J. Herrera, A. Miller & F. Engert ; «Probabilistic Models of Larval Zebrafish Behavior Reveal Structure on Many Scales» ; Current Biology **30**, p. 70–82.e4 (2020). ISSN 09609822. 91, 112

[115] J. Jordi, D. Guggiana-Nilo, E. Soucy, E. Y. Song, C. Lei Wee & F. Engert ; «A High-Throughput Assay for Quantifying Appetite and Digestive Dynamics» ; American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **309**, p. R345–R357 (2015). ISSN 0363-6119, 1522-1490. 91

[116] J. Jordi, D. Guggiana-Nilo, A. D. Bolton, S. Prabha, K. Ballotti, K. Herrera, A. J. Rennekamp, R. T. Peterson, T. A. Lutz & F. Engert ; «High-Throughput Screening for Selective Appetite Modulators : A Multibehavioral and Translational Drug Discovery Strategy» ; Science Advances **4**, p. eaav1966 (2018). ISSN 2375-2548. 91

[117] S. Wolf, G. Le Goc, S. Cocco, G. Debrégeas & R. Monasson ; «Emergence of Collective Spontaneous Neural Properties from a Data Driven Model» ; In preparation (2021). 92

[118] S. Wolf ; *The neural substrate of goal-directed locomotion in zebrafish and whole-brain functional imaging with two-photon light-sheet microscopy* ; Thèse de doctorat ; Université Pierre et Marie Curie ; Laboratoire Jean Perrin (2017). 95

[119] D. J. Odde & H. M. Buettner ; «Autocorrelation Function and Power Spectrum of Two-State Random Processes Used in Neurite Guidance» ; Biophysical Journal **75**, p. 1189–1196 (1998). ISSN 00063495. 98

[120] R. Chaudhuri & I. Fiete ; «Computational Principles of Memory» ; Nature Neuroscience **19**, p. 394–403 (2016). ISSN 1097-6256, 1546-1726. 101

[121] J. S. Goldman, N. Tort-Colet, M. di Volo, E. Susin, J. Bouté, M. Dali, M. Carlu, T.-A. Nghiem, T. Górski & A. Destexhe ; «Bridging Single Neuron Dynamics to Global Brain States» ; Frontiers in Systems Neuroscience **13**, p. 75 (2019). ISSN 1662-5137. 102

[122] J. J. Knierim & K. Zhang ; «Attractor Dynamics of Spatially Correlated Neural Activity in the Limbic System» ; Annual Review of Neuroscience **35**, p. 267–285 (2012). ISSN 0147-006X, 1545-4126. 102

[123] A. Peyrache, M. M. Lacroix, P. C. Petersen & G. Buzsáki ; «Internally Organized Mechanisms of the Head Direction Sense» ; Nature Neuroscience **18**, p. 569–575 (2015). ISSN 1097-6256, 1546-1726. 102

[124] S. S. Kim, H. Rouault, S. Druckmann & V. Jayaraman ; «Ring Attractor Dynamics in the *Drosophila* Central Brain» ; Science **356**, p. 849–853 (2017). ISSN 0036-8075, 1095-9203. 102

[125] E. Schneidman, M. J. Berry, R. Segev & W. Bialek ; «Weak Pairwise Correlations Imply Strongly Correlated Network States in a Neural Population» ; Nature **440**, p. 1007–1012 (2006). ISSN 0028-0836, 1476-4687. 103

[126] S. Cocco, S. Leibler & R. Monasson ; «Neuronal Couplings between Retinal Ganglion Cells Inferred by Efficient Inverse Statistical Physics Methods» ; Proceedings of the National Academy of Sciences **106**, p. 14 058–14 062 (2009). ISSN 0027-8424, 1091-6490. 103

[127] A. Tang, D. Jackson, J. Hobbs, W. Chen, J. L. Smith, H. Patel, A. Prieto, D. Petrusca, M. I. Grivich, A. Sher, P. Hottowy, W. Dabrowski, A. M. Litke & J. M. Beggs ; «A Maximum Entropy Model Applied to Spatial and Temporal Correlations from Cortical Networks In Vitro» ; Journal of Neuroscience **28**, p. 505–518 (2008). ISSN 0270-6474, 1529-2401. 103

[128] G. Tavoni, U. Ferrari, F. P. Battaglia, S. Cocco & R. Monasson ; «Functional Coupling Networks Inferred from Prefrontal Cortex Activity Show Experience-Related Effective Plasticity» ; Network Neuroscience **1**, p. 275–301 (2017). ISSN 2472-1751. 103

[129] L. Posani, S. Cocco & R. Monasson ; «Integration and Multiplexing of Positional and Contextual Information by the Hippocampal Network» ; PLOS Computational Biology **14**, p. e1006 320 (2018). ISSN 1553-7358. 103

[130] L. Meshulam, J. L. Gauthier, C. D. Brody, D. W. Tank & W. Bialek ; «Collective Behavior of Place and Non-Place Neurons in the Hippocampal Network» ; Neuron **96**, p. 1178–1191.e4 (2017). ISSN 08966273. 103

[131] E. T. Jaynes ; «Information Theory and Statistical Mechanics» ; Physical Review **106**, p. 620–630 (1957). ISSN 0031-899X. 103

[132] S. Cocco & R. Monasson ; «Adaptive Cluster Expansion for Inferring Boltzmann Machines with Noisy Data» ; Physical Review Letters **106**, p. 090 601 (2011). ISSN 0031-9007, 1079-7114. 104

[133] J. Barton & S. Cocco ; «Ising Models for Neural Activity Inferred via Selective Cluster Expansion : Structural and Coding Properties» ; Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment **2013**, p. P03 002 (2013). ISSN 1742-5468. 104

[134] W. Krauth ; *Statistical Mechanics : Algorithms and Computations* ; numéro 13 dans Oxford Master Series in Physics Statistical, Computational, and Theoretical Physics ; 1re édition (Oxford Univ. Press, Oxford) (2010) ; ISBN 978-0-19-851535-7 978-0-19-851536-4. 105

[135] S. Karpenko ; *Light-Seeking Navigation in Zebrafish Larvae : From Behavior to Neural Circuits* ; Thèse de doctorat ; Sorbonne Université ; Laboratoire Jean Perrin (2020). 108, 109

[136] X. Chen, Y. Mu, Y. Hu, A. T. Kuan, M. Nikitchenko, O. Randlett, A. B. Chen, J. P. Gavornik, H. Sompolinsky, F. Engert & M. B. Ahrens ; «Brain-Wide Organization of Neuronal Activity and Convergent Sensorimotor Transformations in Larval Zebrafish» ; Neuron **100**, p. 876–890.e5 (2018). ISSN 08966273. 109

[137] A. W. Hamood & E. Marder ; «Animal-to-Animal Variability in Neuromodulation and Circuit Function» ; Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **79**, p. 21–28 (2014). ISSN 0091-7451, 1943-4456. 109

[138] T. Yokogawa, M. C. Hannan & H. A. Burgess ; «The Dorsal Raphe Modulates Sensory Responsiveness during Arousal in Zebrafish» ; Journal of Neuroscience **32**, p. 15 205–15 215 (2012). ISSN 0270-6474, 1529-2401. 113

[139] R. Amo, F. Fredes, M. Kinoshita, R. Aoki, H. Aizawa, M. Agetsuma, T. Aoki, T. Shiraki, H. Kakinuma, M. Matsuda, M. Yamazaki, M. Takahoko, T. Tsuboi, S.-i. Higashijima, N. Miyasaka, T. Koide, Y. Yabuki, Y. Yoshihara, T. Fukai & H. Okamoto ; «The Habenulo-Raphe Serotonergic Circuit Encodes an Aversive Expectation Value Essential for Adaptive Active Avoidance of Danger» ; Neuron **84**, p. 1034–1048 (2014). ISSN 08966273. 113

[140] T. Kawashima, M. F. Zwart, C.-T. Yang, B. D. Mensh & M. B. Ahrens ; «The Serotonergic System Tracks the Outcomes of Actions to Mediate Short-Term Motor Learning» ; Cell **167**, p. 933–946.e20 (2016). ISSN 00928674. 113

[141] R. Madelaine, M. Lovett-Barron, C. Halluin, A. S. Andalman, J. Liang, G. M. Skariah, L. C. Leung, V. M. Burns & P. Mourrain ; «The Hypothalamic NPVF Circuit Modulates Ventral Raphe Activity during Nociception» ; Scientific Reports **7**, p. 41 528 (2017). ISSN 2045-2322. 113

[142] R. Candelier, M. Sriti Murmu, S. Alejo Romano, A. Jouary, G. Debrégeas & G. Sumbre ; «A Microfluidic Device to Study Neuronal and Motor Responses to Acute Chemical Stimuli in Zebrafish» ; Scientific Reports **5**, p. 12 196 (2015). ISSN 2045-2322. 114

[143] T. L. van der Plas, J. Tubiana, G. Le Goc, G. Migault, M. Kunst, H. Baier, V. Bormuth, B. Englitz & G. Debrégeas ; «A Maximum Entropy Graphical Model Unveils Brain-Wide Neural Assembly Organization in Zebrafish» ; In preparation (2021). 115, 117, 119

[144] D. O. Hebb ; *The Organization of Behavior : A Neuropsychological Theory.* (Wiley, London) (1949) ; ISBN 978-1-4106-1240-3. 115

[145] K. D. Harris ; «Neural Signatures of Cell Assembly Organization» ; Nature Reviews Neuroscience **6**, p. 399–407 (2005). ISSN 1471-003X, 1471-0048. 115

[146] L. Lin, R. Osan, S. Shoham, W. Jin, W. Zuo & J. Z. Tsien ; «Identification of Network-Level Coding Units for Real-Time Representation of Episodic Experiences in the Hippocampus» ; Proceedings of the National Academy of Sciences **102**, p. 6125–6130 (2005). ISSN 0027-8424, 1091-6490. 115

[147] J. Shlens, G. D. Field, J. L. Gauthier, M. Greschner, A. Sher, A. M. Litke & E. J. Chichilnisky ; «The Structure of Large-Scale Synchronized Firing in Primate Retina» ; Journal of Neuroscience **29**, p. 5022–5031 (2009). ISSN 0270-6474, 1529-2401. 115

[148] B. Bathellier, L. Ushakova & S. Rumpel ; «Discrete Neocortical Dynamics Predict Behavioral Categorization of Sounds» ; Neuron **76**, p. 435–449 (2012). ISSN 08966273. 115

[149] S. A. Romano, T. Pietri, V. Pérez-Schuster, A. Jouary, M. Haudrechy & G. Sumbre ; «Spontaneous Neuronal Network Dynamics Reveal Circuit's Functional Adaptations for Behavior» ; Neuron **85**, p. 1070–1085 (2015). ISSN 08966273. 115

[150] G. Diana, T. T. J. Sainsbury & M. P. Meyer ; «Bayesian Inference of Neuronal Assemblies» ; PLOS Computational Biology **15**, p. e1007 481 (2019). ISSN 1553-7358. 115