

**THÈSE DE DOCTORAT
DE SORBONNE UNIVERSITÉ**

Spécialité : Physique

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

réalisée

Laboratoire Jean Perrin

sous la direction de Volker Bormuth

présentée par

Hugo Trentesaux

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Sujet de la thèse :

**Intégration multisensorielle dans le cerveau de la larve de poisson
zèbre**

soutenue le 1^{er} février 2020

devant le jury composé de :

| | | |
|-----------------|--------------------------|--------------------|
| M. | ? | Rapporteur |
| M. | ? | Rapporteur |
| M. | Christoph Schmidt-Hieber | Tuteur |
| M ^{me} | Marie Breau | Marraine |
| M. | Volker Bormuth | Directeur de thèse |
| M. | Georges Debrégeas | Directeur de thèse |

Table des matières

| | | |
|----------|---|----------|
| I | Introduction | 1 |
| I.1 | Introduction générale | 1 |
| I.1.1 | L'intégration de l'environnement sensoriel, une fonction complexe | 1 |
| I.1.2 | Des techniques d'imagerie trop locales ou trop globales | 1 |
| I.1.3 | L'échelle intermédiaire, neurones en réseaux sur le cerveau entier | 1 |
| I.1.4 | La larve de poisson zèbre, un organisme modèle en neurosciences | 2 |
| I.1.5 | La microscopie à feuille de lumière, un scanner 3D rapide | 2 |
| I.1.6 | La réalité virtuelle pour l'interaction dans un environnement sensoriel riche | 2 |
| I.2 | Intégration multisensorielle | 2 |
| I.2.1 | Définition | 2 |
| I.2.2 | Exemples et illusions | 3 |
| | a) Orientation verticale | 3 |
| | b) Reconnaissance du langage | 3 |
| | c) Détection d'une source sonore | 3 |
| | d) Illusion proprioceptive | 4 |
| I.2.3 | Mécanismes et échelles | 4 |
| | a) À l'échelle du cerveau | 4 |
| | b) À l'échelle du neurone unique | 4 |
| | c) Intégration inconsciente ou interaction | 5 |
| I.2.4 | Le système vestibulaire chez la larve de poisson zèbre | 5 |
| | a) Limites des études actuelles | 5 |
| | b) Le poisson zèbre comme animal modèle adapté | 5 |
| I.3 | Imagerie fonctionnelle par microscopie à feuille de lumière | 6 |
| I.3.1 | Comment enregistrer le cerveau entier ? | 6 |
| I.3.2 | Imagerie fonctionnelle calcique | 6 |
| | a) Architecture et fonctionnement du neurone | 6 |
| | b) Le calcium dans le neurone | 6 |
| | c) GCaMP, rapporteur calcique | 8 |
| I.3.3 | Microscopie à fluorescence et feuille de lumière | 8 |
| | a) Principe de la microscopie | 8 |
| | b) Fluorescence | 9 |
| | c) Sectionnement optique | 9 |
| | d) Microscopie confocale | 9 |
| | e) Microscopie deux photons | 10 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| f) | Microscopie à feuille de lumière | 11 |
| I.4 | Intégration multisensorielle chez la larve de poisson zèbre | 11 |
| I.4.1 | Boucle sensorimotrice | 11 |
| a) | Imagerie en nage libre | 12 |
| b) | Réalité virtuelle | 12 |
| I.4.2 | Modèle viso-vestibulaire | 12 |
| a) | Système visuel | 13 |
| b) | Système vestibulaire | 13 |
| c) | Intégration viso-vestibulaire | 15 |
| I.5 | Objectifs de la thèse | 15 |
| II | Contrôle postural dans un environnement virtuel | 17 |
| II.1 | Description de la boucle sensorimotrice | 17 |
| II.1.1 | Roulis | 17 |
| II.1.2 | Tangage | 18 |
| II.2 | Étude comportementale du contrôle postural | 19 |
| II.2.1 | Plateforme expérimentale | 19 |
| a) | Stimulation vestibulaire | 20 |
| b) | Imagerie et analyse | 20 |
| c) | Stimulation visuelle | 21 |
| d) | Insertion de la larve | 21 |
| II.2.2 | Protocoles et résultats | 22 |
| a) | Test par l'OMR | 22 |
| b) | Rétroaction vestibulaire | 23 |
| c) | Protocole multimodal | 24 |
| d) | Interprétation | 26 |
| II.2.3 | Conclusion | 28 |
| III | Imagerie fonctionnelle sous stimulation vestibulaire | 29 |
| III.1 | Microscope rotatif | 29 |
| III.1.1 | Description du montage | 30 |
| a) | Unité d'illumination | 30 |
| b) | Unité de détection | 30 |
| c) | Stabilité mécanique | 31 |
| III.1.2 | Nappe laser par balayage | 32 |
| a) | Ouverture numérique optimale | 32 |
| b) | Balayage horizontal et vertical | 33 |
| III.2 | Analyse des données | 34 |
| III.2.1 | Logiciels existants | 35 |
| a) | Fiji | 35 |
| b) | Suite2P | 35 |
| c) | CaImAn | 35 |
| III.2.2 | Solution utilisée pour l'analyse de nos données | 35 |
| a) | Étapes principales de l'analyse de données | 35 |
| b) | Améliorations pratiques et techniques | 39 |
| c) | Pistes d'améliorations | 40 |

| | |
|---|-----------|
| III.3 Résultats | 41 |
| III.3.1 Carte de réponse en roulis et en tangage | 41 |
| IV Microscope à feuille de lumière deux photons rotatif | 43 |
| IV.1 Effet deux photons | 44 |
| IV.1.1 Principe | 44 |
| IV.1.2 Concentration spatiale | 44 |
| IV.1.3 Concentration temporelle | 44 |
| IV.2 Fibre optique, principe et état de l'art | 46 |
| IV.2.1 Guide d'onde | 46 |
| IV.2.2 Fibre optique monomode à saut d'indice | 46 |
| IV.2.3 Fibre à âme vide | 47 |
| a) Guide d'onde métallique ou diélectrique | 47 |
| b) Fibres à cristaux photoniques | 47 |
| c) Fibres à courbure négative | 48 |
| IV.2.4 Utilisation des fibres optiques en microscopie embarquée | 48 |
| a) Imagerie sur rongeur à tête fixée | 48 |
| b) Déportation de l'illumination | 50 |
| c) Déportation de l'illumination et de la détection | 50 |
| d) Lentilles à gradient d'indice | 50 |
| e) Microendoscopes | 50 |
| IV.3 Caractérisation et utilisation de fibres à âme vide | 51 |
| IV.3.1 Comparaison de fibres | 51 |
| IV.3.2 Injection d'un laser dans une fibre | 51 |
| a) Principe | 51 |
| b) Injection 2P | 53 |
| c) Injection combinée 2P + 1P | 54 |
| IV.3.3 Propriétés | 54 |
| a) Dispersion et pré-compensation | 54 |
| b) Gain de courbure | 54 |
| c) Polarisation | 55 |
| d) Test en conditions réelles | 58 |
| IV.4 Effet de lentille thermique | 59 |
| IV.4.1 Effet statique | 59 |
| a) Cas d'une cellule fine | 60 |
| b) Simulation numérique | 61 |
| IV.4.2 Effet dynamique | 62 |
| A Appendice | 63 |
| A.1 Langage de programmation adapté | 63 |
| A.1.1 Memory mapping | 63 |
| a) Matlab | 63 |
| b) Python | 64 |
| c) Julia | 64 |
| Bibliographie | 67 |

Chapitre I

Introduction

I.1 Introduction générale

I.1.1 L'intégration de l'environnement sensoriel, une fonction complexe

De nombreux animaux sont capables de se repérer et de se déplacer dans leur environnement, une fonction complexe qui nécessite de traiter des entrées sensorielles multiples et de produire une réponse motrice adaptée. Le système nerveux, constitué d'un réseau de neurones capables de guider l'information depuis les organes sensoriels vers le cerveau, et depuis le cerveau vers les organes moteurs répond bien à ce problème. Ce traitement centralisé de l'information permet d'atteindre un grand niveau de complexité. On compte par exemple dans le cerveau humain plusieurs dizaines de milliards de neurones.

I.1.2 Des techniques d'imagerie trop locales ou trop globales

On dispose aujourd'hui d'outils pour appréhender cette complexité comme l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), qui mesure un rapporteur de l'oxygénation du sang, et donc de l'activité locale des tissus cérébraux. Cette technique est cependant limitée à une résolution spatiale de l'ordre du millimètre cube, soit une centaine de milliers de neurones et à une résolution temporelle de l'ordre du Hertz [1]. À l'opposé, les techniques d'électrophysiologie comme patch-clamp permettent d'enregistrer l'activité électrique du neurone unique avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde mais sont invasives et limitées à une centaine de neurones simultanément [2].

I.1.3 L'échelle intermédiaire, neurones en réseaux sur le cerveau entier

Ces techniques ont engendré beaucoup de découvertes sur le fonctionnement global et local du cerveau, mais peinent à décrire des phénomènes qui concernent l'échelle intermédiaire : un faible nombre de neurones répartis sur l'entiereté du cerveau. C'est précisément à cette échelle que se situe l'intégration multisensorielle, c'est-à-dire la manière dont le cerveau combine l'information liée à plusieurs modalités sensorielles pour produire une réponse motrice unique [3]. Ce phénomène fait appel à la fois aux noyaux sensoriels, à des circuits intégrateurs et aux neurones moteurs, autrement dit une petite centaine de

neurones répartis sur le cerveau entier. Pour répondre à ces questions, il a fallu appliquer une nouvelle technique d'imagerie à un nouvel animal modèle.

I.1.4 La larve de poisson zèbre, un organisme modèle en neurosciences

La larve de poisson zèbre, déjà largement utilisée en biologie du développement s'est trouvée bien adaptée à ces questions. À l'âge de six jours après fertilisation de l'œuf, elle possède déjà un système sensoriel fonctionnel (systèmes visuel, vestibulaire, tactile, auditif...) et un répertoire de comportements riche et complexe (nage, chasse, fuite...). Son cerveau est encore de petite taille (cent milles neurones), mais comporte quasiment toutes les régions anatomiques d'un cerveau de vertébré adulte. On dispose d'une grande variété de lignées notamment des mutants dépigmentés transparents et des lignées transgéniques incluant un rapporteur calcique. Ces lignées permettent une imagerie fonctionnelle par fluorescence pour suivre l'activité des neurones.

I.1.5 La microscopie à feuille de lumière, un scanner 3D rapide

La technique d'imagerie la plus utilisée en biologie est certainement la microscopie confocale à fluorescence. Il s'agit d'illuminer point par point l'échantillon avec un faisceau laser et de ne collecter que la fluorescence émise par ce point. Cela permet d'atteindre une très bonne résolution spatiale en échange de résolution temporelle. Pour l'imagerie fonctionnelle neuronale du cerveau entier, la microscopie par feuille de lumière est plus adaptée car elle utilise une illumination plan par plan de l'échantillon par une nappe laser. La résolution temporelle est donc largement augmentée tout en conservant une résolution spatiale suffisante, inférieure à la taille d'un neurone.

I.1.6 La réalité virtuelle pour l'interaction dans un environnement sensoriel riche

Pour étudier le fonctionnement du cerveau, on fixe donc la larve de poisson zèbre transgénique sous un microscope à feuille de lumière. Il est possible d'étudier l'activité spontanée des neurones, mais pour explorer la réponse du cerveau à une stimulation sensorielle, il faut créer ces stimuli. La manière la plus aboutie de recréer cette stimulation sensorielle est la réalité virtuelle, c'est-à-dire un environnement sensoriel qui réagit aux actions motrices comme si le sujet n'était pas fixé.

I.2 Intégration multisensorielle

I.2.1 Définition

L'intégration multisensorielle est le processus par lequel le cerveau combine les informations perçues pour produire une représentation interne de l'environnement extérieur. La prise d'information peut passer par plusieurs modalités sensorielles comme les systèmes visuel, vestibulaire, tactile, auditif, olfactif, proprioceptif, ou encore somesthésique. Ces différentes modalités peuvent donner des informations cohérentes qui se complètent pour améliorer la perception mais également des informations contradictoires qui peuvent entraîner des illusions sensorielles.



FIGURE I.1 – Kathryn Hunter, dans la pièce de théâtre *The Valley of Astonishment*, mise en scène par Peter Brook. Le personnage est synesthète, et associe dans sa mémoire plusieurs modalités sensorielles.

I.2.2 Exemples et illusions

a) Orientation verticale

Prenons par exemple la perception de l'orientation haut-bas. Le système vestibulaire détecte l'accélération gravitationnelle et nous donne une information de la direction verticale et de l'orientation vers le bas. Le système visuel détecte les lignes verticales dans notre champ de vision (arbres, arêtes des murs) et distingue le ciel lumineux du sol plus sombre. Ces deux modalités sont en général cohérentes, mais on peut concevoir une salle dans lesquelles toutes les lignes sont penchées, ce qui peut perturber nos sens au point de nous faire perdre l'équilibre.

b) Reconnaissance du langage

Autre exemple avec la reconnaissance du langage : on comprend mieux une personne quand on la voit parler. L'information auditive du son de la voix est combinée à l'information visuelle des mouvements des lèvres et autres expressions, ce qui améliore la compréhension. Mais on peut tromper le cerveau en faisant écouter un son qui ne correspond pas aux mouvements des lèvres, ce qui est alors interprété comme un autre son (cet effet connu sous le nom McGurk).

c) Détection d'une source sonore

Le système auditif permet de déterminer approximativement la direction de la source d'un son grâce à l'espacement entre les deux oreilles, information qui peut être confirmée

lorsque le système visuel identifie la source. Mais lorsque l'on voit un objet bouger au rythme d'un son provenant d'ailleurs, on peut lui attribuer la source du son et ignorer l'information auditive, c'est l'illusion qu'utilisent les ventriloques pour faire parler leur marionnette [4].

d) Illusion proprioceptive

Un exemple encore plus marquant est l'illusion proprioceptive que l'on peut déclencher avec un casque de réalité virtuelle. Dans une situation normale, le sens du toucher est combiné à l'information visuelle pour déterminer la nature des objets que l'on touche. Mais si l'on présente une main factice en image à un sujet, il peut avoir l'illusion que cette main est la sienne au point de ressentir un objet qui touche la fausse main.

1.2.3 Mécanismes et échelles

Ces multiples exemples montrent l'omniprésence de l'intégration multisensorielle dans les phénomènes perceptifs mais n'en indiquent pas les mécanismes neuronaux. Ces derniers sont complexes, avec une origine à la fois à l'échelle du neurone unique et dans l'organisation du cerveau.

a) À l'échelle du cerveau

Une étude en IRMf chez l'humain s'est intéressée à la structure des zones multisensorielles dans le cerveau [5]. Le sujet était exposé à différents stimuli visuels (des visages) et auditifs (de voix) séparément ou combinés. Alors que les zones unisensorielles sont bien délimitées, les zones multisensorielles se sont révélées très imbriquées. À l'échelle du cerveau en imagerie fonctionnelle par résonance magnétique, il est difficile de définir un critère sur la nature multisensorielle ou non d'une région. En effet, une étude comparant plusieurs critères statistiques montre que la superadditivité n'est pas toujours un critère pertinent dans l'étude de l'intégration multisensorielle à cette échelle [6]. Alors que l'idée de cortex sensoriels bien cloisonnés était largement adoptée, une étude sur des macaques a montré que des liaisons pouvaient exister entre les différentes aires sensorielles primaires [7]. Une autre étude sur la gerbille a montré que le cortex auditif primaire recevait des entrées directes des cortex somatosensoriel, visuel et multisensoriel, ainsi que des structures visuelles et multisensorielles du thalamus et du tronc cérébral [8]. Les connections entre les différentes régions du cerveau sont donc à la base de son fonctionnement multisensoriel. Les différentes aires sensorielles au début considérées comme unimodales se sont révélées multimodales. Les études à cette échelle tendent en effet à montrer que les différentes modalités sensorielles sont fortement liées dès un stade précoce du traitement de l'information [3].

b) À l'échelle du neurone unique

Les études à l'échelle du cerveau déconstruisent l'idée de grandes régions unisensorielles mais n'excluent pas une ségrégation des différentes modalités sensorielles à l'échelle du neurone. C'est pourquoi des études ont été menées à cette échelle plus locale. Une d'elles

a révélé des connexions directes entre des neurones visuel et auditif [9] par électrophysiologie sur des furets. Dans une autre, publiée en 2007 [10], les auteurs ont enregistré dans le cerveau de chats par électrophysiologie l'activité de milliers de neurones du sillon temporal supérieur en réponse à des stimuli visuels et auditifs combinés. Certains neurones ne répondaient qu'à un seul stimulus (neurone unimodal) alors que d'autres affichaient une réponse dans les deux cas (neurone bimodal). De plus, l'étude montre qu'il existe en proportion égales des neurones ne répondant qu'en présence des deux stimuli simultanés. Ces neurones ne seraient simplement pas détectés dans des expériences qui ne mettent en jeu qu'une seule des modalités sensorielles. À l'échelle du neurone unique, l'intégration multisensorielle se manifeste par des phénomènes tels que la super-additivité ou la sous-additivité. Certains neurones ont une réponse bien plus forte en présence de plusieurs stimuli simultanés que lorsque ceux-ci sont présentés séparément. L'amplitude de ce phénomène est d'autant plus forte que les stimuli présentent une corrélation spatiale et temporelle [3].

c) Intégration inconsciente ou interaction

Dans une revue de 2008 [11], les auteurs présentent le système vestibulaire comme particulièrement adapté à l'exploration de l'intégration multisensorielle. L'intégration multimodale a lieu très tôt dans les réseaux de neurones vestibulaires et il n'y a pas de sensation consciente du signal capté par les organes mais bien une sensation unifiée qui en résulte. À l'opposé, certains phénomènes d'intégration peuvent avoir lieu de manière consciente, certains auteurs parlent alors d'"interaction multisensorielle" pour distinguer la manière dont plusieurs sensations interagissent entre elles d'une sensation unique résultant de l'intégration [12].

I.2.4 Le système vestibulaire chez la larve de poisson zèbre

a) Limites des études actuelles

Comme nous l'avons vu, le phénomène d'interaction multisensorielle fait intervenir des neurones en petit nombre répartis dans des régions différentes du cerveau. Les études actuelles ont mis en évidence des phénomènes locaux spécifiques à certains neurones et des coactivations de régions globales à différents endroits du cerveau mais ne permettent pas d'obtenir les deux informations en même temps. Ces éléments montrent que l'étude de l'intégration multisensorielle doit nécessairement passer par l'analyse des réseaux entiers à l'échelle du neurone unique. Les études en IRM manquent l'échelle du neurone unique et les études d'électrophysiologie manquent les phénomènes de réseau à l'échelle du cerveau entier. C'est pourquoi un nouveau modèle qui permette de combiner l'échelle du neurone unique et l'échelle du cerveau entier est nécessaire.

b) Le poisson zèbre comme animal modèle adapté

Les cerveaux de mammifères sont composés de milliards de neurones ce qui les rend trop gros pour se prêter à ce genre d'étude. C'est la raison du succès de la larve de poisson zèbre. Ce nouvel animal modèle permet, par la taille réduite de son cerveau et sa transparence de réaliser l'acquisition du cerveau entier à la résolution du neurone par des

techniques d'imagerie fonctionnelle [13]. Cela permet l'étude de phénomènes qui ont lieu à travers tout le cerveau tout en concernant un petit nombre de neurone. Le poisson zèbre partage la structure de son cerveau avec les autres vertébrés tout en ayant un catalogue de comportement assez riche. De nombreuses études concernant ses différentes modalités sensorielles et leur bases neuronales ont été publiées depuis 2013. Comme cité plus haut, le modèle vestibulaire se prête bien à l'étude de l'intégration multisensuelle, c'est donc le système que nous avons choisi d'étudier.

I.3 Imagerie fonctionnelle par microscopie à feuille de lumière

I.3.1 Comment enregistrer le cerveau entier ?

Comme nous l'avons vu, les techniques d'acquisition de l'activité neuronale comme l'électrophysiologie et l'imagerie par résonance magnétique ne sont pas adaptées pour réaliser l'imagerie du cerveau entier à l'échelle du neurone unique. Il est donc nécessaire d'utiliser une technique d'acquisition non invasive capable de telles performances. Travailler sur un animal transparent comme la larve de poisson zèbre facilite l'acquisition utilisant la lumière visible, c'est-à-dire l'imagerie optique. Celle-ci est très développée en biologie et peut assurer à la fois une bonne résolution et un champ large. Cependant, plusieurs innovations importantes à la fois en optique, en ingénierie moléculaire, et en génétique ont dû être combinées pour arriver à un tel résultat. Nous l'introduisons ici.

I.3.2 Imagerie fonctionnelle calcique

a) Architecture et fonctionnement du neurone

Le neurone est une cellule fortement présente dans le cerveau et caractérisée par son prolongement axonal capable de transmettre un influx nerveux. Il est toujours accompagné par des cellules gliales comme les astrocytes ou les oligodendrocytes qui assurent en grande partie les fonctions métaboliques. Il est aujourd'hui considéré comme principal responsable des processus cognitifs bien que de nombreuses recherches montrent l'importance des cellules gliales dans des phénomènes tels que l'intégration du signal calcique et l'établissement de connexions synaptiques [14] [15].

Le neurone est doté d'une longue projection nommée axone, qui lui permet de se connecter et transmettre un signal à d'autres neurones éloignés de lui. Comme la plupart des cellules, des protéines transmembranaires lui permettent d'atteindre une différence de potentiel avec l'extérieur de -70 mV au repos et comme d'autres cellules dites excitables, cela lui permet de transmettre un signal électrique par ouverture et fermeture de canaux ioniques.

b) Le calcium dans le neurone

Le neurone est équipé de pompes et canaux ioniques sur sa membrane qui lui permettent de se polariser en faisant varier la concentration d'ions intracellulaires par rapport au milieu extracellulaire. Ce potentiel électrochimique transmembranaire varie brusquement lors d'événements de dépolarisation qui permettent la propagation d'un message le long des projections axonales vers d'autres neurones. Lors de ces événements, des flux

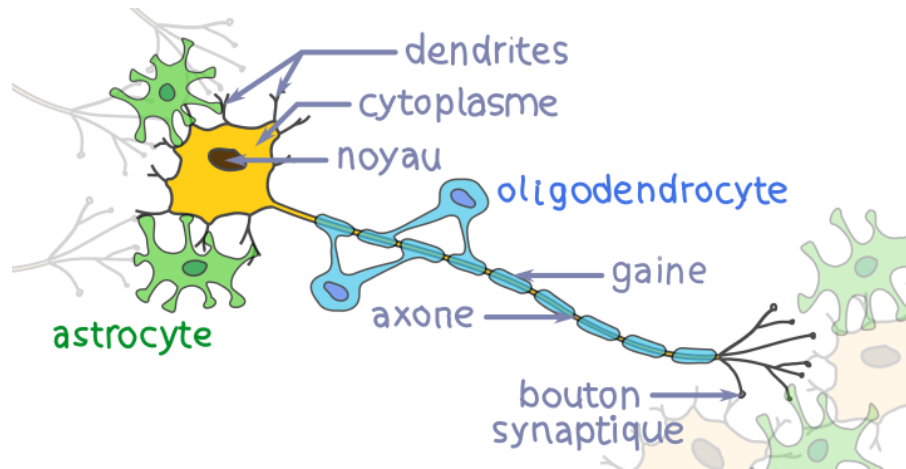


FIGURE I.2 – Schéma d'un neurone accompagné de cellules gliales. Astrocytes (en vert), oligodendrocytes (en bleu). Le neurone dispose d'un long prolongement appelé axone qui le connecte à d'autres neurones via des boutons synaptiques.

d'ions traversent la paroi cellulaire, ce qui modifie largement leur concentration intracellulaire. Par exemple, l'ion calcium (Ca^{2+}) passe d'une concentration de $0.1 \mu\text{mol/L}$ à $10 \mu\text{mol/L}$ soit un facteur 100 [16], la concentration extracellulaire étant de 1 mmol/L , encore cent fois plus. La durée des potentiels d'actions est de l'ordre de la milliseconde, et la concentration de calcium évolue sur des échelles de temps similaires, de l'ordre de la dizaine de millisecondes [?].

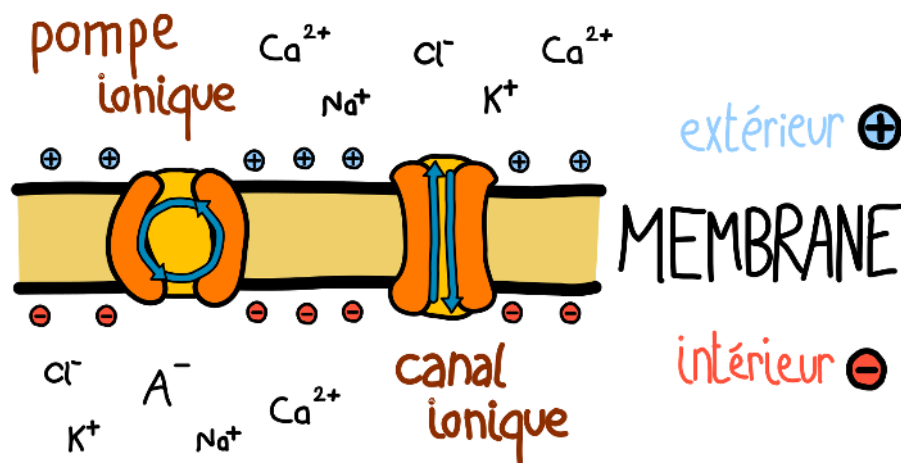


FIGURE I.3 – Des protéines transmembranaires permettent à la cellule de se polariser et de se dépolariser. Les pompes ioniques consomment de l'énergie sous forme d'ATP pour forcer le passage d'ions. Des transporteurs ioniques actifs (symport, antiport) et passifs (uniport) permettent un transport dirigé d'ions. Des canaux sélectifs et non sélectifs permettent un transport rapide.

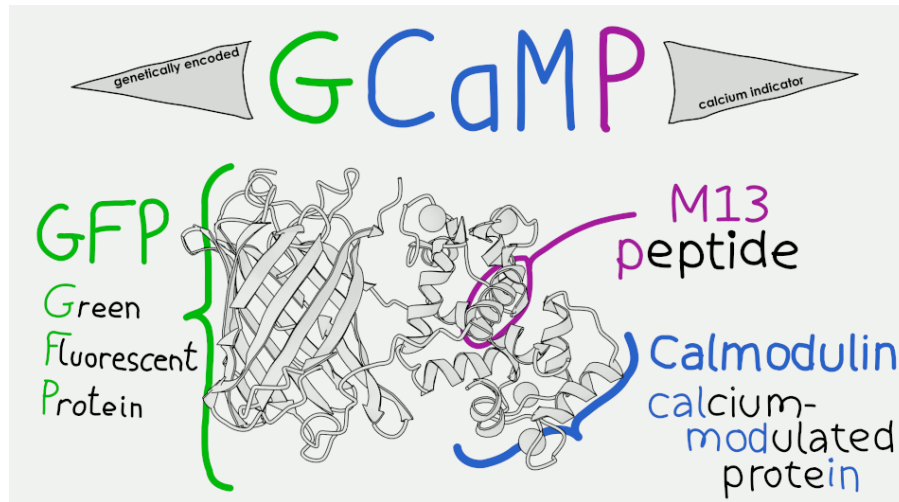


FIGURE I.4 – Structure tridimensionnelle de l'indicateur calcique GCaMP composée de trois ensembles protéiques.

c) GCaMP, rapporteur calcique

Du fait de ses grandes variations de concentration, l'ion calcium est un bon indicateur des potentiels d'actions et donc de l'activité neuronale. C'est la raison pour laquelle des rapporteurs calciques ont été développés. Parmi eux, le rapporteur encodé génétiquement GCaMP résulte de l'assemblage entre la calmodulin (calcium modulated protein), une protéine qui se lie au calcium ce qui change sa conformation, et d'une protéine fluorescente verte (GFP, Green Fluorescent Protein). Le résultat est une protéine qui devient fluorescente en présence d'ion calcium, avec une dynamique de l'ordre du dixième de seconde. Le code génétique de cette protéine peut être inséré dans une région d'intérêt du génome, pour être exprimée dans des populations ciblées de neurones.

Ainsi, l'organisme génétiquement modifié est équipé d'une molécule présente dans les neurones dont la fluorescence varie en fonction de l'activité du neurone. Cela permet de réaliser l'imagerie fonctionnelle, c'est-à-dire l'imagerie des cellules lors de leur fonctionnement, par l'observation des modifications de leur métabolisme aux échelles de temps courtes.

I.3.3 Microscopie à fluorescence et feuille de lumière

a) Principe de la microscopie

Le principe général d'un microscope optique est d'éclairer un échantillon et d'observer la lumière qui rentre dans le système de détection. Sur un échantillon mince, on peut faire de la microscopie en transmission ou en réflexion, mais pour un échantillon biologique épais, le phénomène de diffusion rend ces techniques inutilisables. Lorsque le volume imagé est prédéfini, par exemple en imagerie médicale, il faut se contenter de l'auto-fluorescence et élaborer des techniques sophistiquées pour repousser les limites de la diffusion. Au contraire, lorsque l'on contrôle le volume à imager, il est possible de réaliser un marquage fluorescent qui permet de cibler un sous-ensemble précis du tissu biologique et d'émettre

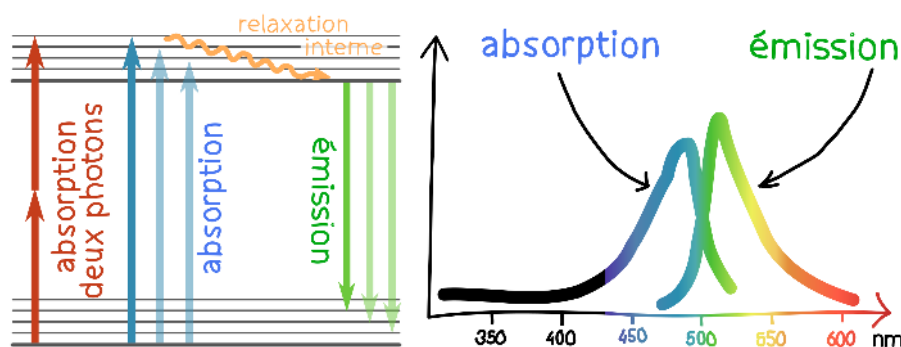


FIGURE I.5 – Illustration du phénomène de fluorescence. À gauche point de vue quantique avec les niveaux d'énergie interne, à droite point de vue ondulatoire avec les spectres d'absorption et d'émission

autour d'une longueur d'onde choisie.

b) Fluorescence

La fluorescence est un phénomène d'absorption-réémission de lumière par une molécule. Dans le cas de GFP (ainsi que GCaMP), la protéine absorbe les longueurs d'onde dans le bleu et émet dans le vert. Il est ainsi possible de stimuler la fluorescence en utilisant un laser à 488 nm (en imagerie un photon) et de collecter la lumière ré-émise.

Un des avantages de la microscopie à fluorescence est qu'avec un jeu de filtres adapté, on peut obtenir un excellent rapport signal à bruit. Ainsi, en plaçant sur la ligne de détection un filtre coupe bande à la longueur d'onde du laser, on peut couper toute lumière venant de celui-ci. En ajoutant un filtre passe bande vert, seule la lumière liée à la fluorescence est détectée.

c) Sectionnement optique

Si l'on éclaire l'ensemble d'un échantillon fluorescent et que l'on tente de l'imager avec un objectif de microscope, le rapport signal à bruit est catastrophique. En effet, pour collecter le maximum de lumière, il faut une grande ouverture numérique et donc une faible la profondeur de champ. Un objet lumineux hors du plan focal apparaît donc totalement flou, ce qui constitue une lumière parasite qui couvre celle émise par les objets dans le plan focal. Il faut donc d'une manière ou d'une autre éliminer la lumière provenant d'en dehors du plan focal.

d) Microscopie confocale

Il existe pour cela plusieurs techniques dites de "sectionnement optique". La plus connue, la microscopie confocale, utilise une illumination focalisée en un seul point. L'objet en ce point est donc fortement éclairé, et le reste beaucoup moins. De plus, un sténopé conjugué à ce point ne laisse passer que la lumière qui en est issue. L'imagerie d'un plan est ensuite obtenue en scannant ce point dans le plan focal, et l'imagerie d'un volume et répétant l'opération pour plusieurs couches. Cette technique est largement répandue et

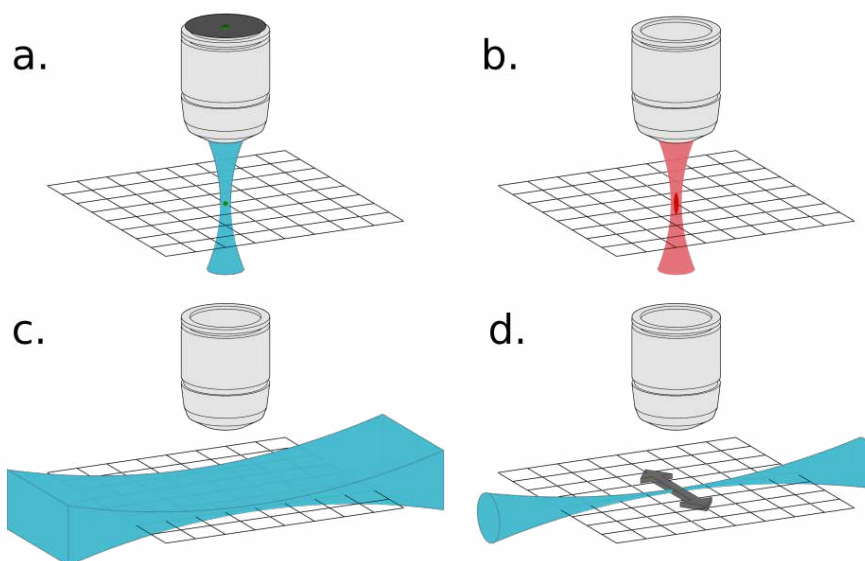


FIGURE I.6 – Sectionnement optique par différentes techniques

- a. Microscopie confocale, un sténopé est placé de manière à bloquer la lumière provenant des points hors focus.
- b. Microscopie deux photons, l'effet deux photons permet d'exciter uniquement la fluorescence dans le point de focalisation du laser.
- c. Feuille de lumière, une nappe produite avec une lentille cylindrique éclaire une couche de l'échantillon.
- d. Balayage laser, une nappe produite par balayage laser éclaire une couche de l'échantillon.

déclinée, et a l'avantage d'être souple et d'atteindre de bonnes résolutions. Cependant, elle ne peut pas combiner une haute définition (10^8 voxels) à une fréquence élevée (1Hz) et doit sacrifier l'un pour l'autre. Elle est donc réservée soit à l'observation détaillée d'échantillons statiques, soit à l'observation peu détaillée d'échantillons dynamiques. Cette lenteur est liée au fait de scanner un point sur une surface, mais on peut gagner en vitesse au détriment du rapport signal à bruit en éclairant une ligne d'un coup et en remplaçant le trou par une fente, car il suffit alors de scanner dans une seule dimension.

e) Microscopie deux photons

La microscopie deux photons utilise une propriété non linéaire de la lumière pour exciter la fluorescence uniquement en un point. De manière analogue à la microscopie confocale, un faisceau est concentré en un point de l'échantillon, mais l'utilisation d'un laser pulsé dans l'infrarouge permet d'atteindre des niveaux de puissance instantanée bien plus élevés tout en pénétrant mieux les tissus biologiques. De plus, l'utilisation d'un sténopé n'est pas nécessaire car l'effet deux photons est proportionnel au carré de l'intensité lumineuse, et seul le point de focalisation est donc excité. Comme la microscopie confocale, il s'agit alors de scanner un point à travers tout l'échantillon, ce qui est trop lent

pour l'imagerie de grands volumes.

f) Microscopie à feuille de lumière

En microscopie confocale ou deux photons, l'illumination passe par le même objectif que la détection. Mais pour certains échantillons, l'éclairage peut également être fait par le côté. Une feuille de lumière coïncidant avec le plan focal de l'objectif peut être produite à l'aide d'une lentille cylindrique, ou bien par balayage d'un faisceau laser. C'est ce qu'on appelle la microscopie à feuille de lumière, microscopie à nappe laser, ou encore SPIM pour *Single Plane Imaging Microscopy*. Cette technique, en dépit d'un rapport signal à bruit et d'une résolution inférieurs à la microscopie confocale, suffit pour réaliser l'imagerie à la résolution cellulaire. De plus, elle permet d'imager un plan entier d'un seul coup, ce qui est bien plus rapide. En scannant l'objectif et la feuille de lumière, on peut ainsi produire une imagerie volumique à fréquence bien plus élevée qu'en microscopie confocale. Par exemple, avec trente couches espacées de dix microns, on peut acquérir l'ensemble du cerveau d'une larve de poisson zèbre à environ 2Hz.

Si la microscopie par fluorescence à feuille de lumière est une technique particulièrement adaptée à la bio-imagerie fonctionnelle, son utilisation reste toutefois relativement faible. En 2011, un article de revue pointait le manque de système commercial en microscopie à feuille de lumière [17]. En 2017, un autre déplorait le faible niveau de propagation de cette technique au regard de ses performances [18]. La technique reste donc cantonnée à des laboratoires capables de développer leur propre microscope en dépit du succès qu'elle rencontre dans ses applications.

I.4 Intégration multisensorielle chez la larve de poisson zèbre

La microscopie à feuille de lumière permet d'enregistrer le cerveau entier d'une larve de poisson zèbre à la résolution du neurone et avec une fréquence de quelques Hertz. Plusieurs études ont mis en œuvre cette technique pour étudier différents aspects du fonctionnement du cerveau. Je m'intéresse ici aux stratégies mises en œuvre pour étudier l'intégration multisensorielle pour étudier la boucle sensorimotrice, et plus particulièrement sur le modèle visuo-vestibulaire.

I.4.1 Boucle sensorimotrice

Une capacité intéressante du cerveau est le fonctionnement en boucle fermée. En effet, à la manière d'un système d'asservissement, il est capable de mesurer un paramètre extérieur, le comparer à une valeur de commande et agir pour le contrôler. Par exemple, lorsqu'un poisson est emporté par le courant d'une rivière, il détecte un flux optique sous lui et déclenche la nage. Le flux optique résultant est alors la somme de la vitesse du poisson par rapport au fluide et de la vitesse du fluide par rapport au sol. Ce flux optique mesuré permet au poisson d'évaluer si sa nage est efficace pour compenser le courant, s'il doit nager plus vite ou moins vite. Beaucoup des réflexes sont en fait des boucles sensorimotrices dans lesquelles les entrées sensorielles servent en permanence à évaluer la sortie motrice. Deux options se présentent pour étudier ces boucles sensorimotrices. L'une est l'étude en nage libre, l'autre est l'étude en environnement virtuel avec rétroaction.

a) Imagerie en nage libre

Une option pour étudier le poisson dans son environnement naturel est de construire un microscope motorisé capable de suivre les mouvements du poisson lors de la nage de manière à toujours pouvoir imager le cerveau. C'est l'approche adoptée par le laboratoire RoLi [19] qui peut ainsi observer certains comportements difficile à reproduire avec un poisson immobilisé. L'illumination par le côté étant impossible dans ce cas, c'est une technique de microscopie structurée développée par Jérôme Mertz [20] qui a été utilisée.

b) Réalité virtuelle

Une autre option pour étudier la boucle sensorimotrice est de reproduire en environnement virtuel pour simuler la boucle de rétroaction sensorimotrice. Un stimulus sensoriel est soumis au poisson qui réagit en fonction. Sa réponse est mesurée et répercutée sur l'environnement virtuel d'une manière fidèle à la réalité ou volontairement biaisée.

b).1 Adaptation motrice fictive Ahrens *et al* ont étudié la boucle sensorimotrice dans le cas de l'OMR [21]. Ils ont pour cela créé un environnement fictif dans lequel une larve paralysée est placée au dessus d'un écran. Des bandes mobiles sont présentées au poisson, ce qui déclenche le réflexe optomoteur. L'activité des neurones moteurs est enregistrée à l'aide d'électrodes (les muscles sont inactifs car le poisson est paralysé), et ce signal est utilisé pour simuler un déplacement par un mouvement des bandes en sens opposé. Dans cet environnement virtuel, ils ont pu tester des mécanismes comme l'adaptation de gain tout en enregistrant l'activité des neurones. Cela a permis d'identifier les neurones responsables de l'augmentation du gain et de la diminution du gain, qui sont essentiels pour le fonctionnement de la boucle de rétroaction.

b).2 Sans rétroaction, comportement d'abandon Dans le même article [21], les auteurs ont testé le comportement du poisson dans un système en boucle ouverte, c'est-à-dire sans rétroaction. Les bandes mobiles sont présentées au poisson à vitesse constante sans prendre en compte l'activité des neurones moteurs. Dans cette situation, le comportement de nage est inhibé malgré la présence de stimulus. Cette inhibition due à l'absence de rétroaction peut durer une dizaine de secondes, même après la remise en marche de la rétroaction. Cela montre l'importance du rétrocontrôle dans le fonctionnement de la boucle sensorimotrice et la nécessité d'un système en boucle fermée pour son étude.

I.4.2 Modèle viso-vestibulaire

Un terrain idéal pour étudier l'intégration multisensorielle est le modèle visuo vestibulaire. Ces deux modalités sensorielles sollicitées de concert lors de la nage pour la stabilisation de la posture et de la vision sont pratiquement développées chez la larve de six jours. En effet, le système visuel est fonctionnel dès 4 jours [22], et le système vestibulaire dès 5 jours (seulement l'utricule) [23]. Mais avant de décrire les réflexes qui mettent en jeux ces deux modalités sensorielles simultanément, intéressons-nous séparément à l'appareil visuel et à l'appareil vestibulaire.

a) Système visuel

a).1 Organisation La partie neuronale du système visuel commence par une rétine munie de cellules qui captent la lumière. La répartition des capteurs en fonction de leur couleur correspond aux teintes rencontrées dans l'habitat naturel du poisson. Des circuits neuronaux dans la rétine réalisent un pré-traitement qui, bien qu'en pleine évolution chez une larve de six jours, lui permet déjà de réaliser des opérations complexes. Par exemple, certaines cellules ganglionnaires rétinienne sont sensibles à l'orientation de motif ou à la direction de mouvement d'un objet, d'autres à la taille d'un objet ou à son évolution [22]. L'étude de l'arborescence de ces ganglions révèle plusieurs zones spécifiques à certains stimuli, comme des variations globales de luminance, le mouvement de petits objets, des déplacements sur tout le champ de vision... La plupart de ces ganglions projettent vers le tectum optique (équivalent du colliculus supérieur chez l'humain) où la suite du traitement est effectuée à travers sa structure laminaire.

[24]

a).2 OMR, réponse optomotrice Certains comportements comme l'OMR (*optomotor response*, réponse optomotrice) et l'OKR (*optokinetic response*, réponse optocinétique) sont purement liés au système visuel. L'OMR est un comportement qui survient de manière très reproductible lors d'un mouvement de translation global dans l'ensemble du champ de vision. La larve se met à nager à l'encontre du flux optique rencontré. Dans la nature, ce comportement permet de compenser le courant d'une rivière pour rester au même niveau en se servant de l'environnement visuel comme référence. En laboratoire, on peut facilement reproduire ce comportement en projetant un motif en translation sous la larve, ce qui provoque des mouvements de queue.

a).3 OKR, réponse optocinétique L'OKR est un mécanisme de stabilisation de la vision dans lequel l'œil compense les mouvements globaux de l'environnement pour en conserver une vision nette. Cette réponse peut également être étudiée facilement en laboratoire en présentant un motif mobile sur un écran face à une larve. Ces deux comportements sont importants dans la réponse aux stimulations vestibulaires en présence d'un environnement lumineux. En effet, une accélération ou une rotation de la larve entraîne mécaniquement un mouvement global de l'environnement visuel de celle-ci.

b) Système vestibulaire

b).1 Organisation L'organe vestibulaire, quant à lui, est situé dans l'oreille interne. Grâce à des cellules ciliées sensibles à leur propre déflexion, il peut mesurer les accélérations inertielle et gravitationnelle auxquelles sont soumises les otolithes (petites pierres osseuses) et les accélérations angulaires du liquide présent dans les canaux semi-circulaires. Bien que quasiment mature chez la larve dès cinq jours, la taille des canaux semi-circulaires les rend inefficace et donc seule l'utricule (un des otolithes) est fonctionnel. Cela est cependant suffisant (et nécessaire [25]) pour que la larve puisse nager tout en conservant son équilibre.

Les neurones répondant aux stimulations vestibulaires sont présents à de nombreux endroits du cerveau, à la fois dans le prosencéphale (télencéphale, habenulae, thalamus,

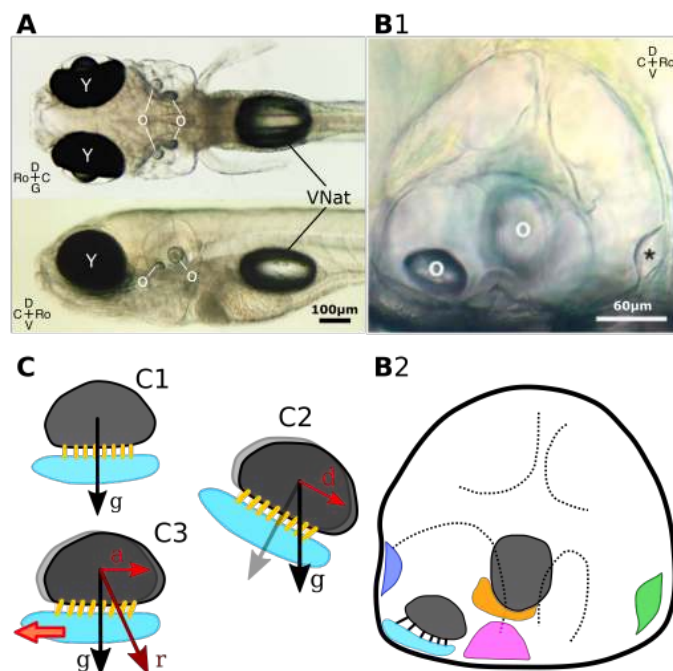


FIGURE I.7 – Schéma adapté de G. Migault

A. Larve de poisson zèbre à 6 jours vue de dessus (haut) et de côté (bas). On distingue les yeux (Y), l'oreille interne avec ses otolithes (O) et la vessie natatoire (VNat).

B. Agrandissement de l'oreille interne vue de côté (B1) avec le schéma correspondant (B2). On souligne en pointillé les canaux semi-circulaires, en gris les deux otolithes, et en couleur les neuro-épithéliums.

C. Otolithe en fonctionnement. Lorsqu'il est à l'horizontale (C1), les cils sont au repos, lorsqu'il est incliné (C2), les cils sont défléchis car l'accélération gravitationnelle change de direction, lorsqu'il est en mouvement accéléré vers la gauche (C3), l'accélération inertielle (a) s'ajoute à l'accélération gravitationnelle (g) et donne la résultante (r). On voit que l'utricule ne permet pas de différencier l'accélération gravitationnelle de l'accélération inertielle.

prétectum), dans le mésencéphale (tectum, nMLF, tegument), et dans le rombencéphale (cervelet, MON, rhombomère 5-7) [26]. Chacune de ces régions est impliquée différemment dans les réflexes vestibulaires comme le réflexe vestibulo-oculaire (*vestibulo-ocular reflex*, VOR) et le contrôle postural où réflexe vestibulo-spinal (*vestibulo-spinal reflex*, VSR).

b).2 VOR, réflexe vestibulo-oculaire Le VOR, largement répandu chez les vertébrés et également observé chez le poisson-zèbre [27]. C'est un mouvement réflexe des yeux qui compense les mouvements de la tête pour stabiliser la vision. Bianco *et al* l'ont mis en évidence chez la larve de poisson zèbre de plus de 4 jours en la soumettant à une rotation selon l'axe de tangage, ce qui génère une rotation des yeux opposée, avec un angle limité par le maximum physiologique. Le circuit neuronal associé est constitué d'un neurone afférent primaire, un neurone vestibulaire de second ordre, et un motoneurone oculaire qui guide la rotation de l'œil. Ce circuit est présent en deux exemplaires avec une symétrie

bilatérale, pour chacun des utricules. Il a également été montré que les neurones du noyau tangential ont des projections dans les motoneurones oculaires contra-latéraux, et que ces neurones sont essentiels au fonctionnement du réflexe.

b).3 VSR, réflexe vestibulo-spinal Le VSR est un réflexe de contrôle de posture qui utilise également l'information vestibulaire. Chez le poisson zèbre adulte, la vessie nata-toire est un organe important qui permet de contrôler la flottaison, mais chez la larve, elle n'est pas encore fonctionnelle. Les effecteurs du contrôle postural sont donc surtout la queue et les nageoires. Ehrlich *et al* ont étudié le déséquilibre naturel de la larve en tangage et ont montré que les événements de nage sont à la base du développement de l'équilibre [28]. Favre-Bulle *et al* ont étudié le contrôle de l'équilibre dans l'axe de roulis en stimulant directement les utricules dans l'oreille interne et ont constaté une déflexion proportionnelle de la queue [26].

c) Intégration viso-vestibulaire

Les quatre réflexes cités précédemment peuvent être isolés en laboratoire, en contrôlant séparément la stimulation visuelle et la stimulation vestibulaire, mais en réalité, ces réflexes sont très intriqués. En effet, le OKR et le VOR contrôlent tous les deux le mouvement des yeux alors que l'OMR et le VSR contrôlent tous les deux le mouvement de la queue et des nageoires. Dans certains cas, ils peuvent jouer dans le même sens (stimulations cohérentes) alors que dans d'autres ils peuvent entrer en conflit (stimulations incohérentes). C'est précisément cette interaction entre les deux modalités sensorielles qui nous intéresse, et c'est également la raison pour laquelle le système vestibulo-oculaire se prête particulièrement bien à l'étude des stimulations multimodales. Une première étude montre comment dans certains cas, l'information visuelle peut moduler les rotations de l'œil induites par l'utricule [27].

I.5 Objectifs de la thèse

Les objectifs de ma thèse ont été d'une part de reproduire la boucle sensorimotrice du contrôle postural dans un environnement virtuel, et d'autre part de réaliser un montage capable d'acquérir l'activité neuronale lors de stimulations visuelle et vestibulaire simultanées.

Chapitre II

Contrôle postural dans un environnement virtuel

La larve de poisson zèbre est fondamentalement déséquilibrée. Son centre de gravité est décalé vers l'avant par rapport à son centre de flottaison, ce qui la fait piquer du nez dans l'axe de tangage. Une larve paralysée se retrouve sur le flanc dans l'axe de roulis. C'est donc par un contrôle permanent qu'elle se maintient à l'horizontale. Pour cela, elle utilise à la fois les informations visuelle et vestibulaire pour déclencher des mouvements de queue et de nageoires qui la stabilisent. Ces comportements complexes ont été étudiés en nage libre par David Ehrlich et David Schoppik, mais pour comprendre les mécanismes neuronaux à l'œuvre, il est nécessaire de fixer le poisson sous un objectif de microscope. J'ai donc cherché à reproduire ces comportements dans un environnement virtuel en vue d'une étude sous microscope.

II.1 Description de la boucle sensorimotrice

La larve de poisson zèbre évolue dans un environnement en trois dimensions. Elle peut se déplacer suivant les trois degrés de liberté en translation et s'orienter suivant les trois degrés de liberté en rotation. Certains comportements comme la thigmotaxie (affection pour les bords) sont liés à sa position dans son environnement, mais dans le cadre du contrôle postural, on s'intéresse surtout à deux degrés de rotation que sont le roulis et le tangage.

II.1.1 Roulis

Dans l'axe de roulis, la larve contrôle son équilibre par des déflexions de la queue. Si elle penche trop à gauche, elle bascule sa queue vers la droite, un peu comme un humain utiliserait ses bras pour s'équilibrer. Le contrôle postural en roulis se fait donc par une boucle de rétroaction sensorimotrice continue. L'angle de référence est de 0° , l'organe vestibulaire mesure l'écart à cet angle, et la queue le compense par une déflexion opposée. Ce comportement a été observé par Favre-Bulle *et al* en simulant une rotation via une manipulation de l'utricule dans l'oreille interne par des pinces optiques. Cette étude a été réalisée en boucle ouverte, c'est-à-dire sans rétroaction, ce qui fait que la larve ne

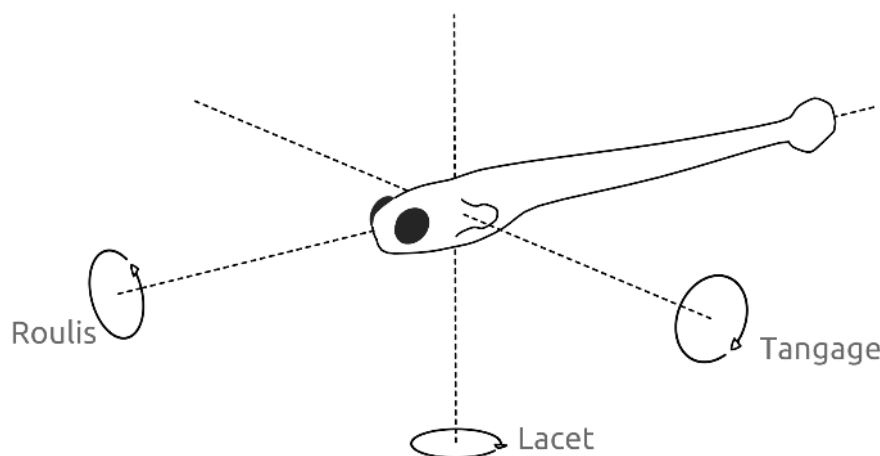


FIGURE II.1 – Larve de poisson zèbre dans sa position naturelle. Cette position est hors équilibre, un poisson inactif tourne sur l'axe de roulis et de tangage.

pouvait pas constater les effets de son mouvement. Une expérience de réalité virtuelle en rétroaction pourrait simuler un déséquilibre proportionnel à l'angle de la queue, ce qui permettrait à la larve d'en corriger l'angle en temps réel.

II.1.2 Tangage

Dans l'axe de tangage, la situation est plus compliquée. L'angle que fait la larve avec l'horizontale dépend de sa direction de déplacement. Par exemple, une larve se place à un angle positif lorsqu'elle nage vers le haut pour remonter à la surface et un angle négatif quand elle nage vers le bas [29]. Cet angle constitue une référence autour de laquelle la larve cherche à se stabiliser. Ehrlich et Schoppik ont montré que le contrôle de l'angle se faisait exactement pendant les mouvements de nage [28]. La larve de poisson zèbre nage de manière discrète via des mouvements réguliers à une fréquence d'environ un par seconde en nage libre. Entre deux mouvements, elle est soumise à son déséquilibre et son nez tombe à une vitesse déterminée par sa morphologie. Lors d'un mouvement, en fonction de la force et la position des nageoires, l'angle augmente d'un coup. De plus, les auteurs suggèrent que l'initiation du mouvement est induite par l'angle ressenti. Ils ont augmenté artificiellement le déséquilibre de la larve, conduisant à une chute plus rapide. Ils ont constaté que la larve compensait ce déséquilibre supplémentaire par une augmentation de la fréquence des mouvements de nage. Le contrôle postural en tangage est donc le résultat d'une boucle de rétroaction sensorimotrice discrète. L'angle de référence varie entre -15° et $+20^\circ$ environ et dépend de la direction souhaitée par le poisson. L'action de contrôle de l'angle implique à la fois la queue et les nageoires et se fait au moment des événements de nage, dont la fréquence peut être ajustée en fonction du déséquilibre.

On voit ici deux boucles sensorimotrices différentes impliquées dans le contrôle postural. Ces boucles de rétroaction ont des caractéristiques différentes en terme de valeur cible et de mécanisme de contrôle. Je décris par la suite une plateforme expérimentale que j'ai mise au point afin d'étudier le contrôle postural en réalité virtuelle.

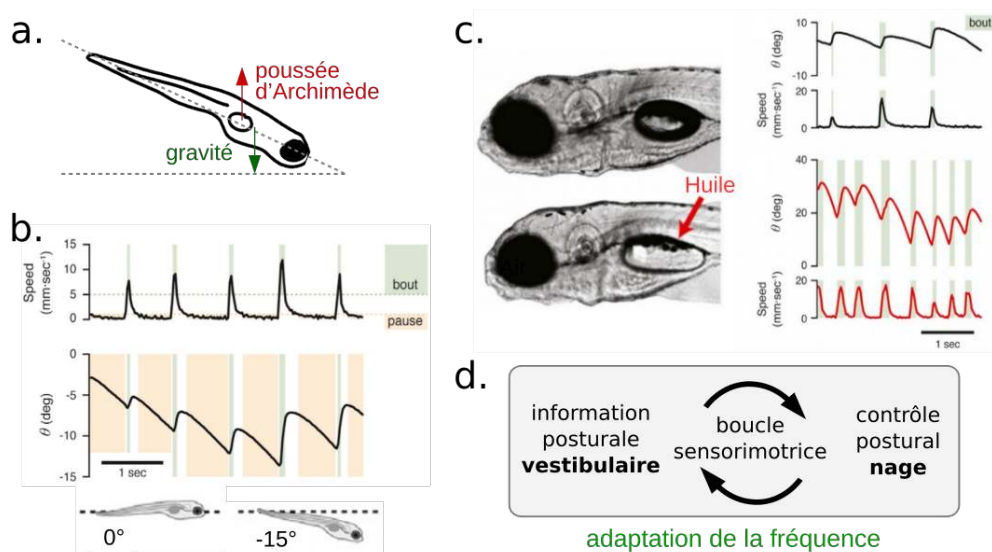


FIGURE II.2 – Adapté de Ehrlich et al [28]

a. Le centre de gravité et de flottaison de la larve sont décalés, ce qui cause un déséquilibre dans l'axe de tangage.

b. La larve nage de manière discrète (non continue), à une fréquence de 1 Hz. Entre deux événements, la larve inactive est entraînée par son déséquilibre, nez vers le bas à une vitesse de 6°/sec. Lors des événements de nage (pic de vitesse), l'angle est corrigé de 6°.

c. En remplaçant l'eau de la vessie natatoire par de l'huile, ce qui augmente le déséquilibre, les auteurs ont constaté une augmentation de la fréquence (diminution de l'IEI, intervalle inter-événement), ce qu'ils attribuent au contrôle de la posture via l'information vestibulaire.

d. La boucle sensorimotrice discrète responsable du contrôle postural est capable d'une adaptation en fréquence suite à une perturbation de l'équilibre du poisson.

II.2 Étude comportementale du contrôle postural

II.2.1 Plateforme expérimentale

Pour reproduire la boucle de rétroaction du contrôle postural, il faut soumettre le poisson à une stimulation vestibulaire, détecter ses mouvements de queue et rétroagir sur son orientation. J'ai développé une plateforme expérimentale pour répondre à cette problématique. Elle est constituée d'une cuve où l'on place la larve, d'un système d'imagerie pour suivre les mouvements de queue, d'un projecteur pour projeter un environnement visuel sur les parois de la cuve, d'un moteur pour entraîner la plateforme sur laquelle repose le tout, et d'un ordinateur pour réaliser la boucle de rétroaction. Je décris ci-dessous les différents éléments.

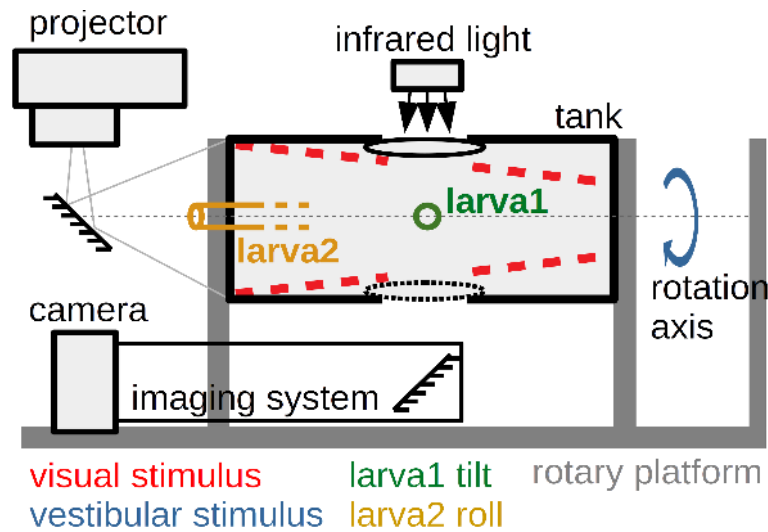


FIGURE II.3 – Plateforme expérimentale permettant d’étudier le contrôle postural d’une larve de poisson zèbre pendant une boucle de rétroaction.

a) Stimulation vestibulaire

Le but de la cuve rotative est de soumettre le poisson à un stimulus vestibulaire contrôlé, et de pouvoir agir rapidement sur la commande (position angulaire, vitesse angulaire). Le moteur que j’ai utilisé pour entraîner la plateforme est le modèle DMAC17 de l’entreprise [midi-ingénierie](<http://www.midi-ingenierie.com/>). Le modèle était assez ancien et ne disposait que d’une interface rudimentaire, j’ai donc du réimplémenter une commande série pour communiquer avec le microcontrôleur de la commande moteur. Finalement, la communication introduit une latence de quelques dizaines de millisecondes et impose un délai entre deux instructions. Cela semble cependant suffisant pour garantir une bonne impression de réalité virtuelle, puisque chez l’humain, les effets liés à la latence commencent à se faire sentir à partir de 75 ms [30]. Un problème que j’ai rencontré au début était les mouvements de l’eau dans la cuve. Le poisson y est très sensible via sa ligne latérale postérieure, ce qui faussait les expériences. En modifiant légèrement la cuve, j’ai pu maintenir l’eau de la cuve pratiquement immobile.

b) Imagerie et analyse

Pour détecter de manière fiable les mouvements de queue du poisson, j’ai mis au point un système d’imagerie adapté. Le système doit être léger et compact, afin de limiter le couple lors de la rotation de la plateforme et être insensible aux vibrations. Le poisson est éclairé par une lampe infrarouge à travers un diffuseur et une fenêtre située en haut de la cuve. En bas de la cuve, une autre fenêtre étanche laisse passer la lumière vers un miroir sur lequel pointe une caméra équipée d’un objectif grossissant et d’un filtre infrarouge. L’utilisation de la lumière infrarouge, invisible pour le poisson, permet de conserver la même qualité d’image quelque soit l’environnement visible pour le poisson. Les fenêtres sont les plus petites possible et situées dans l’extrémité du champ de vision du poisson afin de contrôler au mieux son environnement visuel. Le miroir permet de conserver la

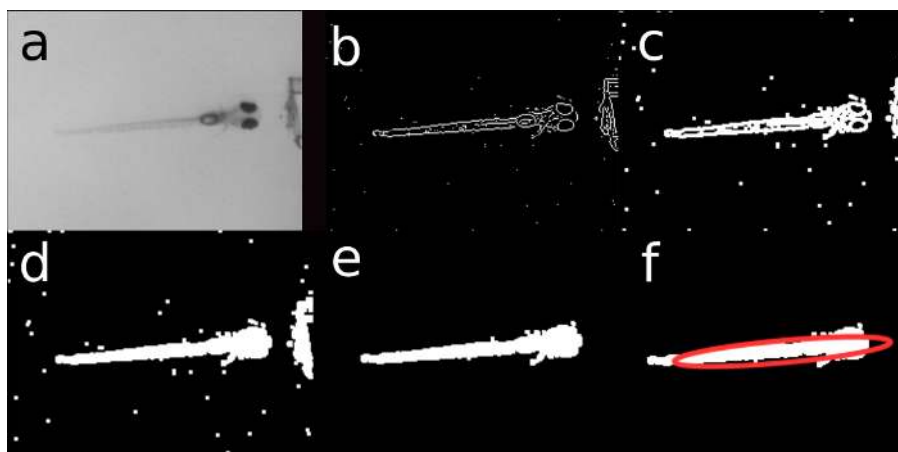


FIGURE II.4 – Traitement d'image en cinq étapes pour obtenir l'angle du poisson. a) image originale sous éclairage infrarouge b) filtre de Sobel c) dilatation morphologique d) remplissage des contours e) ouverture morphologique f) ellipse équivalente via les moments d'ordre deux de l'image

caméra et l'objectif proche de l'axe de rotation de la plateforme, pour limiter le bras de levier. L'objectif du système d'imagerie est choisi pour que le poisson soit imagé sur un nombre réduit de pixels de la caméra. Ainsi, le transfert de donnée depuis la caméra vers l'ordinateur et le traitement de l'image sont rapides, ce qui permet de ne pas ralentir la rétroaction. Le traitement de l'image est simpliste mais fonctionnel. Il consiste à appliquer les fonctions suivantes :

- filtre de Sobel (fonction 'edge' de Matlab, option 'sobel') - dilatation (fonction 'imdilate') - remplissage (fonction 'imfill') - ouverture (fonction 'bwareaopen') - ellipse équivalente (fonction 'regionprops', option 'Orientation')

Ce qui permet de trouver l'angle du poisson de manière reproductible d'une image sur l'autre, afin de détecter les mouvements de queue.

c) Stimulation visuelle

Pour avoir un contrôle très souple sur l'environnement visuel du poisson du point de vue des couleurs, de la luminosité, et des formes, la solution idéale est un projecteur. Afin d'obtenir un bon contraste, les parois de la cuve sont coniques et blanches, réalisées dans un cylindre de PVC. Un cache évite d'éclairer directement le poisson pour ne pas perturber son environnement visuel. Les motifs sont réalisés à l'aide de **psychtoolbox**, une bibliothèque conçue pour l'affichage de stimulations visuelles. Pour conserver une fréquence d'affichage indépendant de la boucle de rétroaction et ainsi garantir un taux d'image par seconde constant d'expérience en expérience, j'ai séparé le processus de la boucle principale, avec laquelle il communique par le protocole TCP/IP.

d) Insertion de la larve

Pour immobiliser la larve de poisson zèbre, il est fréquent de la piéger dans un gel d'agarose à basse température de fusion concentré à 2% aspiré par un capillaire en verre de

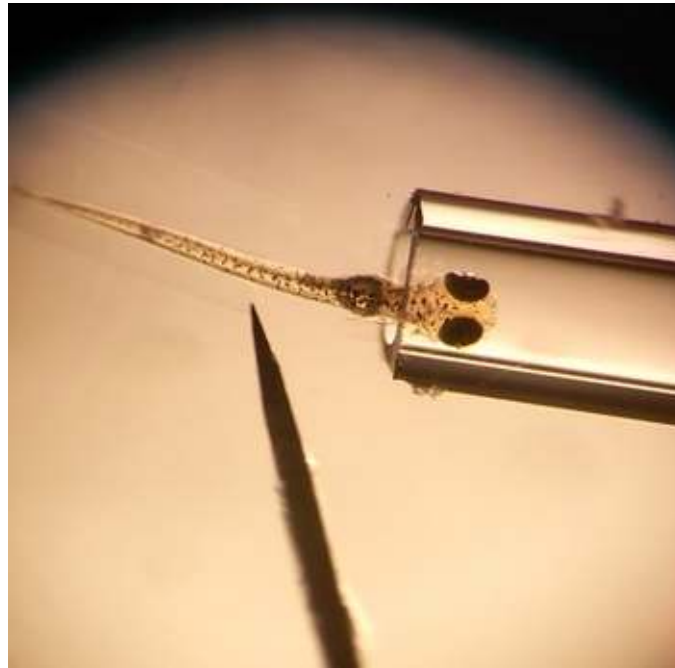


FIGURE II.5 – À l’aide d’un scalpel, un boudin d’agar est retiré de la queue d’une larve pour lui permettre de bouger. La larve est retenue par la tête et le corps, l’autre partie du boudin étant tenue par le capillaire en verre.

diamètre intérieur 0.8 mm. La larve peut ainsi être insérée et maintenue par des trous de 1.4 mm, le diamètre extérieur du capillaire. Il en existe deux dans ma cuve : l’un sur l’axe de rotation pour étudier la réponse comportementale à une stimulation en roulis, l’autre perpendiculaire pour étudier la réponse à une stimulation en tangage. Afin d’observer les mouvements de la queue, je la libère en retirant la partie du boudin d’agarose qui l’entoure.

II.2.2 Protocoles et résultats

a) Test par l’OMR

Après avoir inséré un poisson dans la cuve, je le laisse reposer une à deux minutes pour lui permettre de s’adapter à son nouvel environnement. Je teste ensuite son réflexe optomoteur (OMR). Si le poisson ne réagit pas à cette stimulation visuelle, il est possible que sa vision ou sa motricité ne fonctionne pas, ou que son cerveau ne soit pas dans un état propice à l’étude de son système sensori-moteur. Pour tester l’OMR, je présente une alternance de bandes noires et blanches d’une taille apparente de trente degrés défilant à une vitesse apparente de vingt degrés par seconde, uniquement sur la partie basse de l’environnement visuel. Ce protocole est inspiré par celui présenté par Kris Severi [31]. J’ai réalisé ce test en boucle ouverte, c’est-à-dire sans rétroaction. Dans ce régime, le poisson présente un phénomène d’habituation si la stimulation dure trop longtemps, j’ai donc alterné des périodes de dix secondes de bandes fixes et dix secondes de bandes mobiles.

Ces expériences sur le réflexe optomoteur montrent que le stimulus visuel projeté est

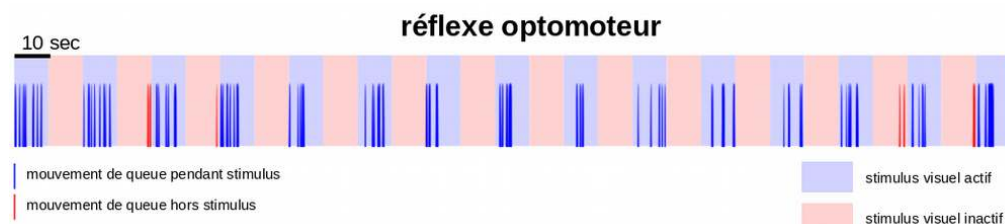


FIGURE II.6 – Expérience d'OMR en boucle ouverte. On voit que le poisson nage systématiquement en présence de stimulation visuelle (440 événements sur 150 secondes) et qu'il nage très rarement en absence de stimulation visuelle (22 événements sur 150 secondes).

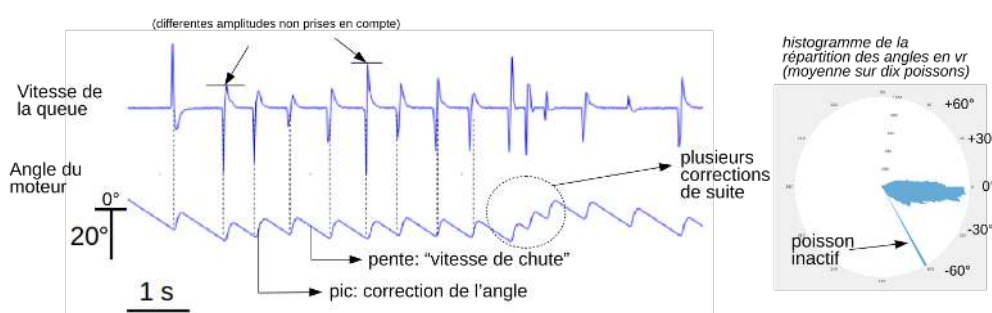


FIGURE II.7 – Zoom sur un exemple de contrôle de posture dans une boucle de rétroaction virtuelle. Le poisson est soumis à un stimulus vestibulaire constant (pente constante) en l'absence de comportement. Lors d'un mouvement de nage, une rétroaction sur l'angle de la plateforme simule une correction d'angle du poisson.

suffisant pour étudier les réponses de la larve à son environnement visuel (Fig. II.6).

b) Rétroaction vestibulaire

Pour mettre en place la boucle de rétroaction vestibulaire, je me suis inspiré de l'étude en nage libre de Ehrlich *et al* [28]. J'ai choisi une vitesse de chute de $6^\circ/\text{s}$ et une correction angulaire rapide de 10° lors d'un mouvement (en 100 ms environ). Ainsi, le poisson peut se maintenir à un angle fixe avec un mouvement toutes les 1.6 secondes. Si le poisson est immobile, son angle diminue jusqu'à l'angle limite que j'ai fixé à -60° . Ces expériences ont été réalisées dans le noir ou en éclairage uniforme, pour étudier la perception vestibulaire indépendamment de la perception visuelle.

Les paramètres de la boucle sont la vitesse de chute et l'angle de correction lors du mouvement. Pour répondre à une modifications de ces paramètres, le poisson doit adapter la fréquence de ses mouvements, car l'amplitude n'est pas prise en compte. Ainsi, à correction angulaire fixe, si la vitesse de chute augmente, comme dans l'expérience de la vessie natatoire remplie d'huile, le poisson doit augmenter la fréquence de ses mouvements. Au contraire, à vitesse de chute fixe, si la correction angulaire augmente, le poisson doit baisser la fréquence de ses mouvements. C'est effectivement ce que l'on constate dans les expériences, où une vitesse de chute de $2^\circ/\text{s}$, $4^\circ/\text{s}$ et $6^\circ/\text{s}$ avec une correction angulaire de

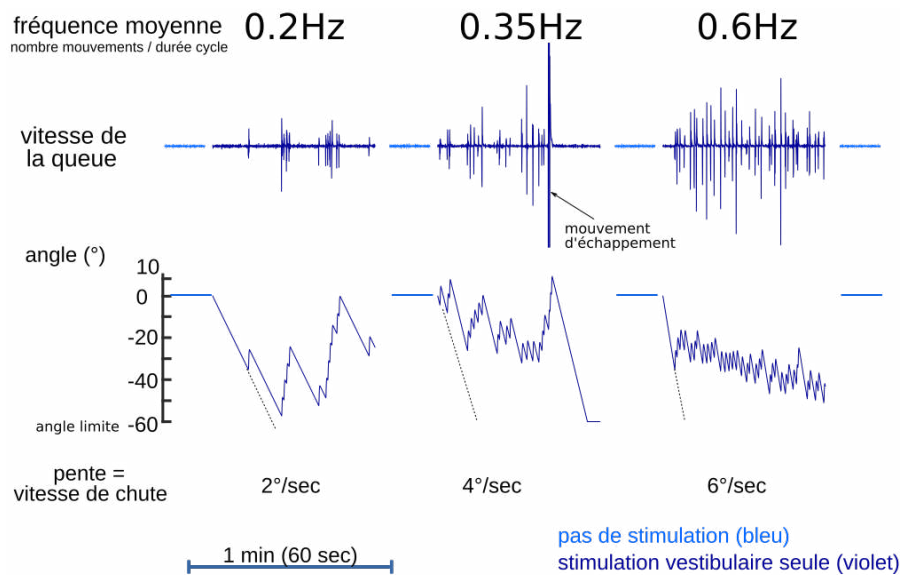


FIGURE II.8 – Réponse d'une larve à une variation de la vitesse de chute. Trois cycles de une minute de stimulation vestibulaire sont séparés de pause de dix secondes. Le poisson se maintient autour d'un angle de -20° quelle que soit la vitesse de chute imposée, en adaptant la fréquence de ses mouvements.

La fréquence moyenne du deuxième cycle est légèrement inférieure à sa valeur attendue (0.35 Hz au lieu de 0.4 Hz). Cela est dû au fait que, suite à un mouvement d'échappement, le poisson est totalement inactif à la fin du cycle et stationne à -60° . Si l'on calcule la fréquence en ignorant les dix dernières secondes, la fréquence moyenne est bien de 0.4 Hz.

10° entraînent respectivement chez la larve une fréquence de mouvement de 0.2 Hz, 0.4 Hz, et 0.6 Hz en moyenne.

La principale difficulté de ces expériences est le fait que le poisson peut devenir inactif et stationner à l'angle minimal autorisé par le système (-60°). C'est pour cette raison que la durée choisie pour les cycles est relativement courte (60 secondes). À la fin d'un cycle, le poisson est ramené à l'angle de référence (0°). Cela évite que le poisson reste trop longtemps inactif, état dans lequel il est impossible d'étudier le contrôle postural. Pour obtenir des fréquences représentatives, il faut donc les calculer uniquement sur les périodes d'activité.

On observe ce même comportement sur des larves dans une boîte de pétri : de temps en temps elles cessent toute activité et reposent sur le fond de la boîte. La boucle de rétroaction du contrôle postural est alors en pause. Dans le cas d'une larve prisonnière d'un boudin d'agarose, les périodes d'inactivité font souvent suite à un mouvement d'échappement (*struggle*), pendant lequel la larve tente de s'échapper en se tortillant sur elle-même avec des mouvements de très grande amplitude.

c) Protocole multimodal

L'intérêt de l'environnement virtuel est qu'il est possible de contrôler à la fois la stimulation vestibulaire et la stimulation visuelle. Après avoir étudié le contrôle postural

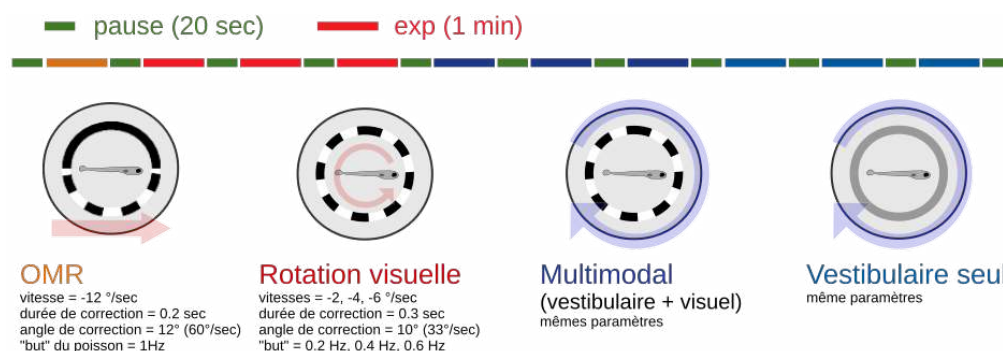


FIGURE II.9 – Exemple de protocole multimodal, faisant intervenir à la fois une stimulation vestibulaire et une stimulation visuelle. Des cycles d'une minute sont séparés par des pauses de vingt secondes.

dans le noir, j'y ai ajouté une composante visuelle. L'objectif est de comparer la réponse en cas de stimulation multimodale par rapport aux réponses en présence des deux stimuli séparément.

Le protocole commence par un cycle d'OMR qui permet d'évaluer le niveau d'activité du poisson. S'il ne répond pas à cette stimulation, l'expérience est interrompue pour passer au poisson suivant, ce qui évite d'observer pendant un quart d'heure une larve immobile. Ensuite vient une phase de stimulation purement visuelle avec rotation de l'ensemble de l'environnement, tout autour du poisson. Pendant cette phase, l'information visuelle indique au poisson qu'il tourne, ce qui est en conflit avec l'information vestibulaire. La partie inférieure du champ visuel est similaire à une stimulation d'OMR, mais la partie supérieure diffère. Il est de toute façon difficile de différencier les deux. Ensuite, en conservant le motif de la phase visuelle en position fixe dans le référentiel du laboratoire, la cuve tourne avec le poisson pour stimuler le système vestibulaire, utile au contrôle postural. Pendant cette phase, les deux modalités sensorielles sont cohérentes. Elles indiquent toutes les deux au poisson qu'il est en train de tourner. Ensuite, le motif est remplacé par un éclairage uniforme d'intensité moyenne identique. Cela permet de conserver une luminosité ambiante dans la cuve identique au cycle précédent. Cette phase est celle exposée précédemment, dans la partie sur la rétroaction vestibulaire. Chaque phase est séparée en trois sous-phases, avec trois vitesses de stimulus différentes (2, 4, et 6 degrés par seconde), pour étudier l'adaptation aux conditions virtuelles.

La réponse des larves à ce protocole est très variable. De nombreuses données sont inutilisables à cause d'une larve immobile après un mouvement d'échappement, mais dans les données restantes, certains poissons montrent une bonne réponse principalement au stimulus vestibulaire seul, d'autres au stimulus visuel seul, alors que la plupart répondent bien pendant le cycle multimodal. Il semble donc qu'en fonction des poissons l'importance relative des différentes modalités sensorielles dans le contrôle postural soit variable. Pour certains poissons, cependant, la présence simultanée des deux modalités sensorielles semble nécessaire au contrôle postural. Cela peut être interprété de la manière suivante.

Pendant les phases unimodales visuelles, les sensations visuelle et vestibulaire sont en conflit, ce qui peut réduire et même supprimer la réponse motrice, la force de cet effet variant d'un poisson à l'autre. Dans les phases unimodales vestibulaires, le poisson ne

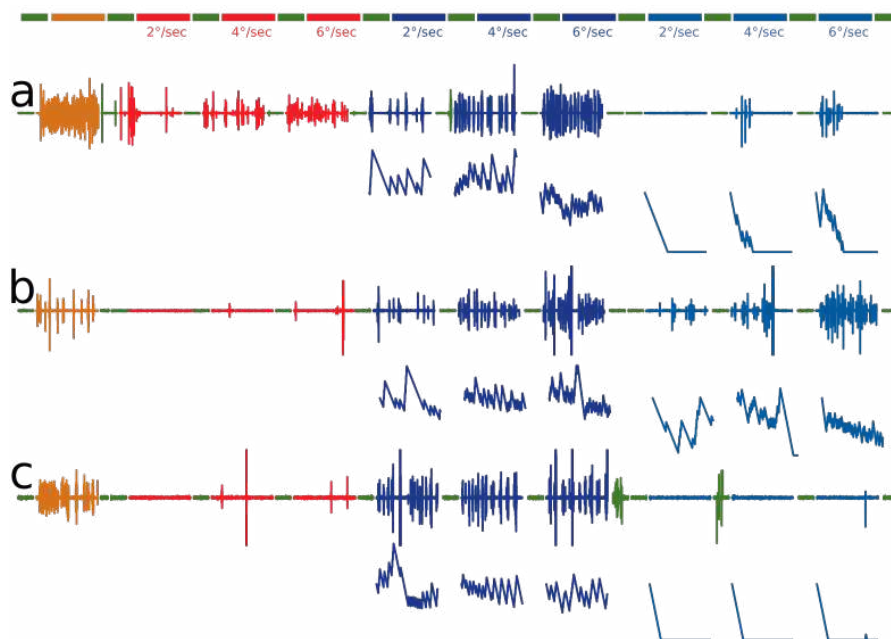


FIGURE II.10 – On voit ici le protocole appliqué sur trois poisson différents. Dans tous les cas, la réponse optomotrice fonctionne, mais on voit des différences au niveau des autres stimuli. Le poisson ‘a’ répond bien à la stimulation visuelle, mais quasiment pas à la stimulation vestibulaire, le poisson ‘b’, au contraire, ne répond pas à la stimulation visuelle (bien qu’il réponde à l’OMR), mais répond à la stimulation vestibulaire pure. Le poisson ‘c’ ne répond ni à la stimulation visuelle pure, ni à la stimulation vestibulaire pure, mais répond comme les deux autres pendant le cycle multimodal. Ces comportements spécifiques à un poisson sont reproductibles. Le protocole a été répété cinq fois sur le poisson ‘a’ avec toujours la même réponse.

reçoit aucune information visuelle sur sa position et la réponse comportementale peut être affaiblie par un manque de fiabilité de l’information vestibulaire. Au contraire, pendant les phases de stimulus multimodal cohérent, on remarque une réponse comportementale forte, augmentée par l’intégration multisensorielle.

d) Interprétation

Malgré ces comportements individuels variables, on peut analyser globalement la réponse des larves. La métrique utilisée est la fréquence moyenne des mouvements, calculée comme le rapport entre la quantité de mouvements de nage et la durée du cycle. Cette métrique inclut les périodes d’inactivité qui suivent un mouvement d’échappement, ce qui fausse légèrement la valeur, comme montré dans l’exemple de rétroaction vestibulaire. On observe néanmoins deux phénomènes : le poisson est capable de moduler son activité en fonction de la force du stimulus, et le poisson a une réponse plus forte en présence de deux stimuli cohérents.

On a montré qu’il était possible de reproduire la boucle de rétroaction sensorimotrice du contrôle postural dans un environnement virtuel. Une des principales limitations

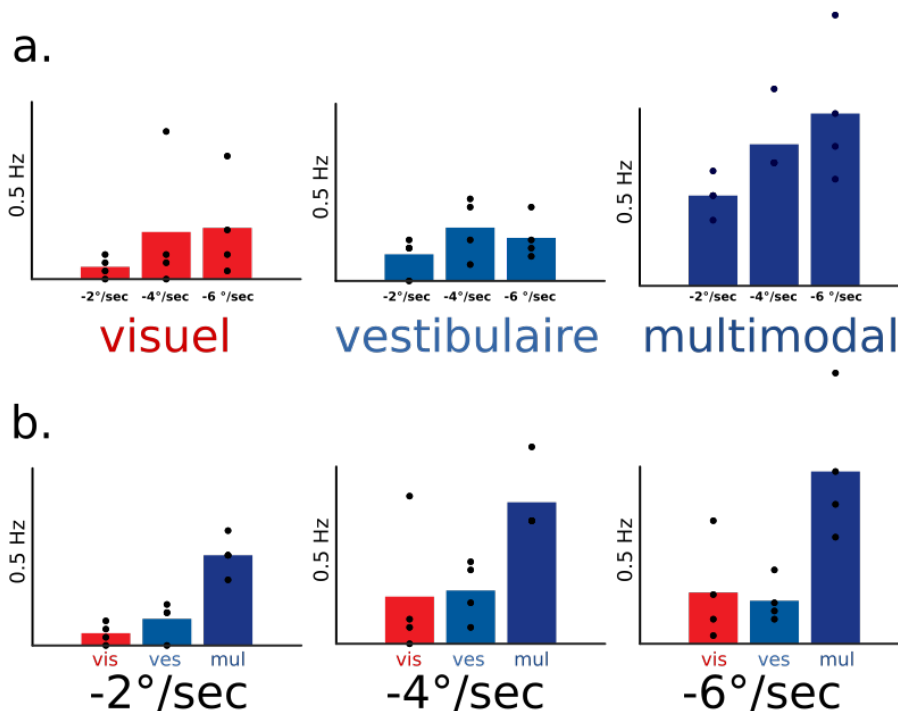


FIGURE II.11 – Analyse réalisée sur dix poissons différents parmi trente soumis au protocole. Les valeurs à zéro (poisson entièrement inactif) sont retirées, et il reste donc environ quatre points par moyenne.

a. Pour chaque cycle, on observe une adaptation du poisson à la force du stimulus. Le poisson est capable d'adapter sa fréquence de nage pour se stabiliser par rapport à une information visuelle ou vestibulaire.

b. Pour chaque vitesse de stimulus, on observe une réponse moyenne différente en fonction du type de stimulus. Alors que le stimulus vestibulaire et visuel pur sont d'efficacité comparable, la présence simultanée des deux modalités sensorielles entraîne globalement une meilleure réponse chez les larves.

est l'immobilisation de la larve, qui provoque des mouvements violents d'échappement suite auxquels la larve est inactive pendant une longue durée. Cela réduit considérablement la quantité de données exploitables (environ 90% des expériences sont en partie ou totalement inutilisables), les données présentées ici sont donc statistiquement faibles.

Ces résultats montrent qu'un réflexe *a priori* vestibulaire comme le contrôle postural est en réalité largement altéré par d'autres modalités sensorielles comme le système visuel. On peut supposer que la sensation tactile, qui permet au poisson de sentir les écoulements de fluide, joue également un rôle (que je n'ai pas testé). La reproduction de la boucle sensorimotrice dans un environnement en réalité virtuelle ouvre la possibilité d'étudier les mécanismes cérébraux qui en sont à l'origine. Pour comprendre en profondeur ces mécanismes, il est nécessaire de simuler un environnement sensoriel riche.

Une piste d'évolution importante serait de limiter ces comportements d'échappement. Ceux-ci diminuent largement l'échantillon statistique en inhibant l'activité du poisson pendant de longues périodes, ce qui rend l'analyse difficile. Cette amélioration pourrait

être obtenue en modifiant la manière dont le poisson est retenu immobile et en ajustant les paramètres de rétroaction en fonction des poissons.

II.2.3 Conclusion

Chapitre III

Imagerie fonctionnelle sous stimulation vestibulaire

III.1 Microscope rotatif

Dans le chapitre précédent, je montre comment tester le comportement d'intégration visuo-vestibulaire dans un environnement en réalité virtuelle. L'objectif est d'observer l'activité du cerveau lors d'un tel comportement. Pour cela, il faut un système capable de réaliser l'enregistrement neuronal en même temps que la stimulation des systèmes vestibulaire et visuel. Cet objectif présente plusieurs difficultés : exciter le système vestibulaire tout en gardant le poisson fixe par rapport à l'objectif de microscope et contrôler son environnement visuel en dépit du laser d'excitation de fluorescence. Dans ce chapitre, je m'intéresse à la partie vestibulaire.

Pour stimuler le système vestibulaire tout en gardant le poisson fixe par rapport à l'objectif, une option est d'agir directement sur l'organe vestibulaire sans bouger la larve. C'est la solution adoptée par Favre Bulle *et al* dans un article publié en 2017 [32]. Les auteurs ont utilisé des pinces optiques pour stimuler directement les otolithes. Cette solution est limitée car il n'est pas possible de calibrer la force appliquée, la concentration du laser produit un échauffement qui limite la durée maximale de la stimulation, et la gamme de force applicable est restreinte.

Au Laboratoire Jean Perrin, Geoffrey Migault et Volker Bormuth se sont tourné vers une autre option : tourner réellement le poisson pour que la gravité bouge ses otolithes. Cette deuxième solution est plus performante, car elle reproduit réellement la stimulation vestibulaire sans les limitations dues aux pinces optiques, mais elle nécessite des développements techniques avancés pour être appliquée sous microscope. En effet, pour conserver le microscope fixe par rapport à un poisson mobile, il faut construire un microscope rotatif, tout en gardant les conditions de stabilité nécessaires à l'imagerie. Un microscope à feuille de lumière rotatif capable de mesurer l'activité du cerveau pendant une stimulation vestibulaire réelle a donc été développé [33].

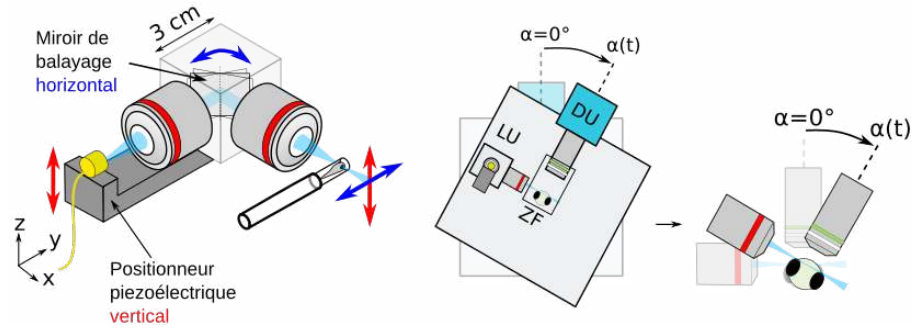


FIGURE III.1 – Schéma extrait de l'article [33]. Le module miniature peut être monté sur un microscope rotatif.

III.1.1 Description du montage

a) Unité d'illumination

Un microscope à feuille de lumière par balayage est généralement constitué de deux bras optiques formant un télescope de manière à placer le miroir rotatif galvanométrique de balayage dans le plan conjugué de l'échantillon. Ainsi, son mouvement de rotation est transformé en une pure translation du faisceau au niveau de l'échantillon. Ce montage est volumineux et inadapté à un microscope rotatif. Il a donc fallu le miniaturiser et garantir sa stabilité. Les télescopes ont été remplacés par des objectifs de microscope. Le plan de Fourier n'étant pas accessible à cause de la distance frontale arrière, le miroir galvanométrique est légèrement hors du plan conjugué, ce qui introduit une rotation du faisceau dans l'échantillon en plus de la translation. Cette rotation reste cependant faible ($<0.4^\circ$), et compatible avec une feuille de lumière par balayage. L'unité d'illumination est composée d'un connecteur de fibre monté sur un positionneur piézoélectrique et de deux objectifs en montage confocal de part et d'autre d'un miroir galvanométrique.

b) Unité de détection

L'enjeu pour une unité de détection rapide est de permettre l'enregistrement avec une durée d'exposition la plus courte possible tout en maintenant un rapport signal à bruit suffisant. Pour collecter beaucoup de lumière, il faut une grande ouverture numérique, et donc une distance de travail faible. Cependant, pour une imagerie à champ large, il faut un grandissement faible. La solution retenue est un objectif Olympus d'ouverture numérique 1 et de grandissement $\times 20$. Le grandissement est donné pour une lentille de tube de 180 mm, mais une lentille de tube de 150 mm a été utilisée, ce qui donne donc un grandissement de $\times 16.667$. Un pixel de la caméra mesure $6.5 \mu\text{m}$, ce qui donne un pixel objet de $0.39 \mu\text{m}$. Le capteur CMOS est un carré de 2048 pixels de côté, ce qui donne un champ objet de 0.8 mm. Le champ objet correspond à la longueur du cerveau, mais le pixel objet est très petit par rapport à un neurone. Pour limiter la quantité de données à enregistrer et augmenter le rapport signal à bruit, on peut combiner par les pixels de la caméra, opération appelée *binning*. Cela donne un pixel objet de $0.78 \mu\text{m}$.

Pour obtenir un bon rapport signal à bruit, il faut réduire la lumière parasite. Une source puissante est le laser d'illumination, elle peut être bloquée spécifiquement avec

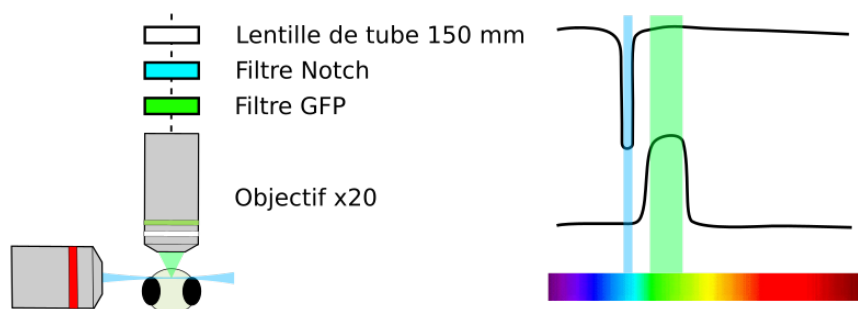


FIGURE III.2 – Schéma du filtrage spectral dans le bras de détection. Le filtre notch (*encoche*) est très étroit et rejette la longueur d'onde du laser (488 nm). Le filtre GFP est plus large et transmet seulement une bande autour de la fréquence de la GFP (525 nm).

un filtre coup bande très étroit à sa longueur d'onde. Un filtre GFP (passe-bande à la longueur d'onde de la GFP) permet de filtrer davantage l'autofluorescence des tissus. Après ce filtrage, les bruits restants sont le bruit de photon et le bruit numérique. Le bruit numérique pourrait être réduit avec un système de refroidissement prévu sur la caméra, mais celui-ci est trop encombrant pour le microscope rotatif, et a donc été retiré. Le bruit de photon ne peut être réduit qu'avec des meilleures sondes calciques ou en exposant plus longtemps, mais il est négligeable devant le bruit numérique d'une caméra non refroidie. Le bruit numérique présente une structure liée à la constitution interne du capteur et qui fait apparaître des raies de pixel et la ligne médiale de l'obturateur déroulant.

c) Stabilité mécanique

Le tout pèse environ 2 kg (?) et tient sur une plaque de 50 cm de côté fixée à un moteur à grand couple et grande précision. Le moteur dispose d'un grand rotor permettant une large zone de fixation qui minimise les déformations mécaniques de la plaque qui soutient le microscope. Nous avons caractérisé précisément l'instabilité liée à la rotation du microscope à l'aide de billes micrométriques fluorescentes.

Une bille fluorescente de 1 μm est éclairée transversalement par le laser d'excitation, qui coïncide avec le plan focal de l'objectif de détection. Elle est imagée pour plusieurs positions hors focus de l'objectif, ce qui fait apparaître des franges d'interférence. Un profil cylindrique de ces franges est réalisé pour plusieurs positions du microscope et à plusieurs intervalles de temps ce qui permet de mettre en évidence le déplacement latéral et vertical de la bille au cours du temps et en fonction de la position du microscope. Cette technique a l'avantage d'être précise (de l'ordre de 100 nm) et robuste aux variations liées au photoblanchiment. Elle a permis de montrer que lors de la rotation du microscope, le déplacement reste inférieur à 500 nm dans la direction verticale et 2 μm dans la direction latérale (cette dernière peut être corrigée lors de l'analyse comme on le voit plus tard).

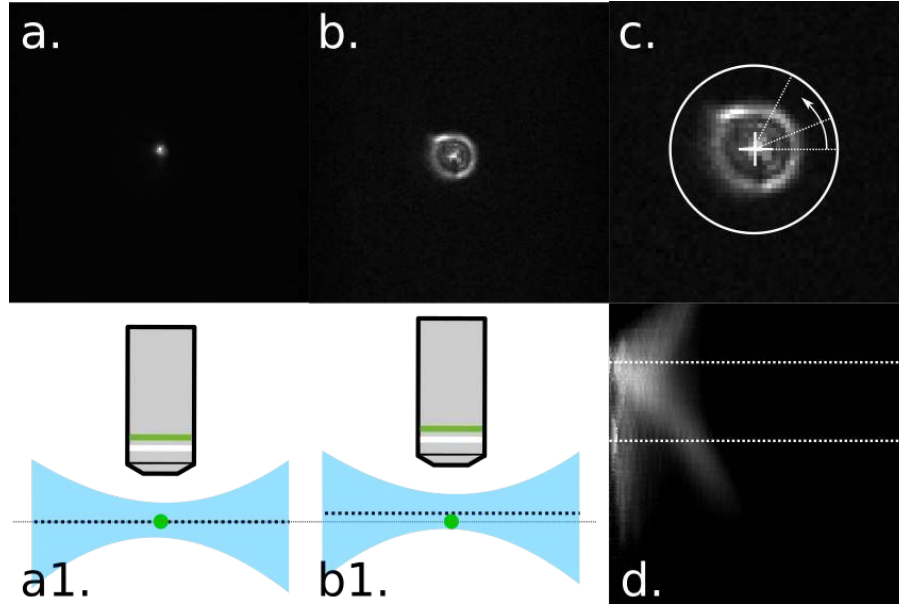


FIGURE III.3 – Schéma des étapes pour estimer avec précision la position d'une bille fluorescente.

- a. Image d'une bille dans le plan focal de l'objectif (a1)
- b. Image d'une bille hors du plan focal de l'objectif (a2)
- c. Établissement du profil radial par moyennage autour du centre de gravité de l'image
- d. Profil cylindrique de la figure de diffraction constitué du profil radial pour plusieurs positions de l'objectif espacées de 20 nm. Les traits pointillés correspondent aux plans (a) et (b). La corrélation verticale du profil cylindrique pour plusieurs positions du microscope donne avec précision le déplacement de la bille.

III.1.2 Nappe laser par balayage

a) Ouverture numérique optimale

Le volume d'un cerveau de larve de poisson zèbre mesure $400\ \mu\text{m}$ de largeur \times $800\ \mu\text{m}$ de longueur \times $300\ \mu\text{m}$ de hauteur et est situé sur le dessus de la larve. Afin de minimiser l'épaisseur de tissus traversée, on place donc l'objectif de détection sur la partie supérieure. Le laser peut donc être placé sur le côté. Les yeux sont très pigmentés et la lumière ne passe pas à travers, ce qui crée une zone d'ombre entre les yeux. Certains laboratoires qui sont intéressés par ces régions appartenant au télencéphale et au diencéphale peuvent donc ajouter un deuxième laser à l'avant pour éclairer cette région.

Pour produire un faisceau laser le plus fin possible sur une longueur de $400\ \mu\text{m}$, il faut minimiser la largeur après $200\ \mu\text{m}$ de propagation avec comme variable le waist w_0 placé au milieu de l'échantillon :

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \quad z_R = \frac{n\pi w_0^2}{\lambda}$$

Un waist trop petit est trop divergeant, et donc trop large sur les bords, mais un waist trop large limite la résolution. Il faut donc trouver un optimum. La taille d'un

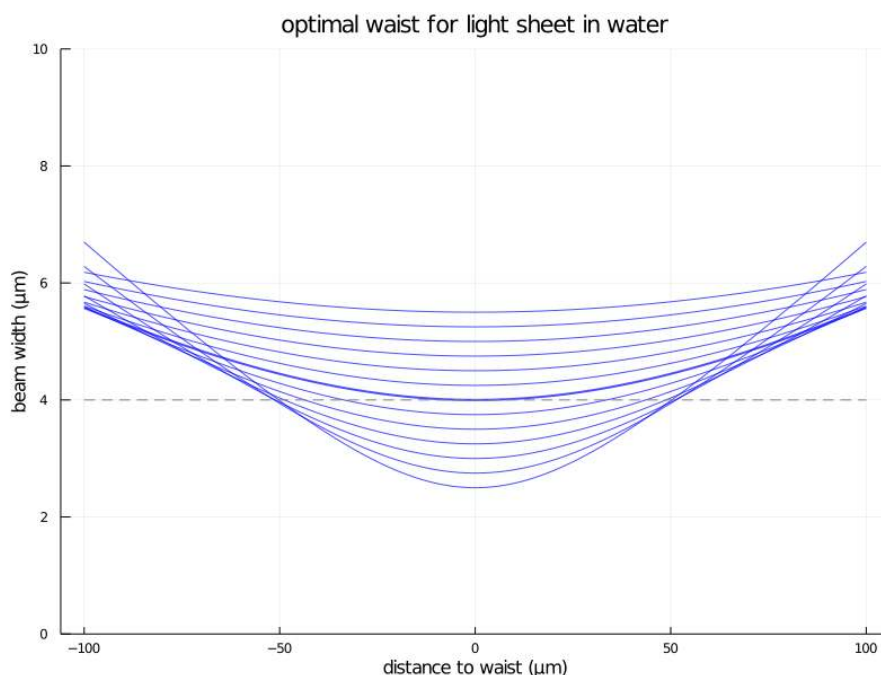


FIGURE III.4 – On voit ici la demi largeur du profil gaussien à 488 nm dans l’eau pour différentes valeurs du waist. Le trait en pointillé montre le rayon d’un neurone. On cherche à minimiser l’épaisseur du faisceau entre -100 μm à 100 μm . Le trait épais marque la position optimale pour ce critère (les autres profils sont tous plus larges à 100 μm du centre). L’ouverture numérique associée vaut $\text{NA} = n \sin(\lambda/\pi n w_0)$.

neurone étant de 8 μm environ, des valeurs inférieures sont souhaitables.

Une valeur de waist possible pour un échantillon de 400 μm est de 3 μm à 488 nm et de 5 μm à 915 nm. Pour ces valeurs, la largeur du faisceau à 488 nm vaut 3 μm au centre et 10 μm sur les bords du cerveau. À 915 nm c’est 5 μm au centre et 14 μm sur les bords mais il faut aussi prendre en compte l’effet deux photons. En pratique, la plupart des neurones sont situés entre -150 μm et +150 μm , la largeur du faisceau aux extrémités n’est donc pas critique.

b) Balayage horizontal et vertical

Pour effectuer le balayage, on déplace le faisceau horizontalement. Pour que l’intensité soit homogène sur une image, il faut adopter une vitesse de déplacement constante. Il est alors possible de faire un aller simple ou des allers-retours en nombre entier pendant le temps d’exposition. Pour obtenir une image volumétrique, il suffit de répéter l’opération pour plusieurs couches, en changeant le plan focal de l’objectif de détection et la position vertical de la nappe. Procéder de cette manière couche après couche force à attendre entre deux couches pour laisser le temps aux éléments mécaniques de se positionner, ce qui prend un temps (environ 10 ms) non négligeable pour des durées d’exposition courtes. Il est également possible de bouger les éléments mécaniques de manière continue en balayant en aller simple. Les couches sont donc légèrement obliques, mais on gagne

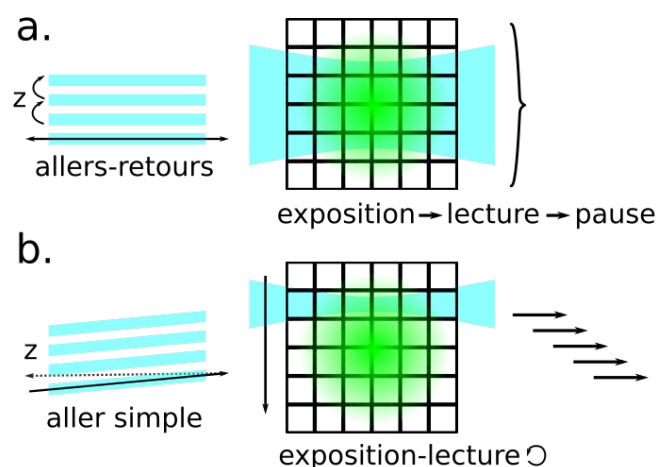


FIGURE III.5 – Différents modes de balayage et de lecture du capteur CMOS. Les couches z successives sont représentées à gauche, le capteur (dans le plan xy) est représenté à droite.

a. Balayage par allers-retours lors de l'exposition de tous les pixels, puis lecture de tous les pixels et déplacement à la couche suivante. Le déplacement étant lent, une pause est nécessaire. Pas d'exposition pendant la pause

b. Balayage par aller simple lors de l'exposition, lecture successive des rangées de pixels et ré-exposition immédiate. Le déplacement vertical est continu à vitesse constante, les couches en z sont légèrement obliques. Le cycle exposition-lecture est décalé dans le temps pour chaque rangée de pixels.

considérablement en fréquence d'acquisition. Cela est possible grâce au mode "synchronous readout" de la caméra qui permet de lire les valeurs d'une ligne de pixels tout en exposant une autre.

Pour un temps d'exposition par couche de 10 ms en mode d'acquisition continu, on peut par exemple réaliser un scan du cerveau à 2,5 Hz en 30 couches espacées de 8 μm . Cela permet d'imager la majeure partie du cerveau du poisson. Les couches les plus profondes sont moins nettes car le signal traverse plus de tissus avant d'atteindre l'objectif, et la zone située entre les yeux reste dans l'ombre si on n'utilise qu'un laser. Mais chaque neurone visible est imagé à une fréquence de 2.5 Hz.

III.2 Analyse des données

L'analyse des données produites par le microscope est en enjeu en lui même. En effet, avec des images de 1024×600 pixels, 20 couches et 25 minutes d'enregistrement à 2 volumes par seconde (3000 pas de temps), on obtient 60000 images. Pour des pixels stockés sur 16 bits, cela donne près de 60 Go de données brutes. Dans ce chapitre, je m'intéresse aux stratégies pour traiter ces données. Les chiffres donnés ci-dessus sont ceux utilisés pour les calculs en ordre de grandeur par la suite.

III.2.1 Logiciels existants

a) Fiji

De nombreux laboratoires de biologie réalisent leur analyse d'image avec Fiji (une distribution du logiciel ImageJ). Cet outil générique offre en effet une bonne interface pour visualiser les données tout en y appliquant des transformations élémentaires, mais montre rapidement ses limites en terme de vitesse, d'automatisation, et de robustesse. Les différents laboratoires travaillant en imagerie neuronale se sont donc tournés vers des logiciels spécialisés.

b) Suite2P

Les laboratoires réalisant de l'imagerie deux photons sur le cerveau de rongeur ont des données de petit volume, mais nécessitant des algorithmes sophistiqués avant d'être exploitables. Le logiciel **suite2p** [34], doté d'une interface graphique intuitive expose une routine puissante pour la correction de mouvement et la détection de cellules par leur activité. Quelques essais sur nos jeux de données ont montré que le logiciel était fonctionnel mais excessivement lent, ce qui rend l'analyse systématique impossible.

c) CaImAn

Plusieurs laboratoires travaillant en microscopie à feuille de lumière analysent leurs données à l'aide de **CaImAn** (pour *Calcium Image Analysis*) [35]. Ce programme est décliné en deux versions, la version *online* pour l'analyse de données en temps réel sur une expérience en cours, et la version *batch* pour l'analyse de données *a posteriori*. La première nécessite des machines très puissantes pour atteindre le taux d'images par secondes requis alors que la seconde peut être exécutée sur des machines modestes. Le logiciel a été publié en 2019, je l'ai essayé sur nos jeux de données avec des résultats satisfaisants en terme de qualité, quoiqu'un peu lents.

III.2.2 Solution utilisée pour l'analyse de nos données

Aucun logiciel adapté à nos données n'étant disponible à l'époque, nous avons développé nos propres méthodes adaptées à l'imagerie sur plateforme rotative. Les spécifications étant très mouvantes, nous avons adopté une structure modulaire dans laquelle une collection de fonctions peuvent être appliquées optionnellement dans un ordre adapté à chaque jeu de données. Je décris ici les étapes principales de l'analyse, les enjeux techniques, et les pistes d'amélioration.

a) Étapes principales de l'analyse de données

a).1 Espace de référence Dans la suite de cette section, j'appellerai de manière équivalente (x,y,z,t) les coordonnées d'un point et les axes dans le repère du poisson. Ces coordonnées sont données dans l'espace de référence RAST (*Right Anterior Superior Time*), c'est-à-dire que l'axe x est orienté vers la droite de la larve, l'axe y vers l'avant, l'axe z vers le haut, et le temps dans le sens naturel.

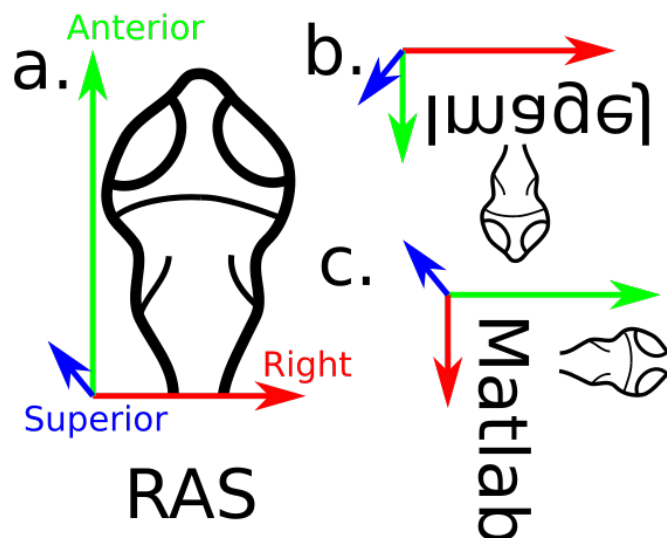


FIGURE III.6 – Illustration de la convention d'orientation RAS (a.) et comparaison avec les systèmes de coordonnées naturels de ImageJ (b. coordonnées des pixels d'un écran) et Matlab (c. coordonnées des éléments d'une matrice).

a).2 Alignement temporel Pour des données à quatre dimensions (x,y,z,t) , il est impératif qu'un pixel (x,y,z) représente toujours le même espace objet dans le cerveau. Une première étape consiste donc à aligner toutes les images entre elles. Dans un cas totalement général, le tissu imagé peut connaître des déformations au cours de l'expérience, et il faut estimer et appliquer la transformation inverse. Suite2P et CaImAn fournissent tous les deux des algorithmes de déformation non rigide, mais ces algorithmes sont coûteux en temps et il est difficile d'estimer numériquement leur performance. De plus, sur des expériences de vingt minutes, les déformations sont généralement trop faibles pour que cette étape soit réellement nécessaire, nous avons donc opté pour une transformation rigide. Cette transformation rigide peut avoir plusieurs degrés de liberté en translation et rotation. Comme précisé dans la partie sur la conception de la plateforme rotative, nous avons obtenu une excellente stabilité en z , les translations restantes sont donc uniquement selon (x,y) , et les rotations sont également négligeables.

Une difficulté pour trouver cette translation est que l'image peut évoluer le long de l'enregistrement. En effet, la répartition de la concentration de calcium peut significativement fluctuer entre le début et la fin de l'expérience, ce qui dans certains cas empêche tout algorithme naïf de fonctionner. Dans le cas de l'imagerie un photon, le signal d'autofluorescence est suffisant pour qu'une simple autocorrélation sur l'ensemble de l'image permette de trouver le déplacement. Dans le cas de l'imagerie deux photons, ce signal étant bien plus faible, l'autocorrélation sur l'ensemble de l'image est dominée par les changements de fluorescence liée à l'activité de neurones. La solution retenue a donc été de réaliser l'autocorrélation sur une zone de l'image stable pendant toute la durée de l'expérience facilement identifiable à l'œil. C'est par exemple le cas pour un neurone mort qui reste toujours dépolarisé.

Cette étape nécessite donc une supervision rapide à l'œil humain mais fonctionne en

général du premier coup et est extrêmement rapide par rapport à tout autre algorithme utilisant l'image entière. De plus, il suffit de réaliser l'opération pour une seule couche et d'extrapoler à tout le volume. Cette étape permet de corriger les déplacements latéraux rapide (x,y) liés directement à la rotation de la plateforme ainsi que la dérive lente en y liée à la contraction du boudin d'agar tenant le poisson.

a).3 Alignement sur un cerveau de référence Après avoir obtenu une matrice 4D alignée temporellement, il est trivial de réaliser une moyenne temporelle qui permet d'obtenir une image avec un bon rapport signal à bruit et moins dépendante de l'activité des neurones. Le volume moyenné suivant le temps peut être aligné sur un volume de référence. Des logiciels comme **CMTK** (*Computational Morphometry Toolkit*) ou **ANTs** (*Advanced Normalization Tools*) permettent de réaliser cet alignement automatiquement. Quand le volume diffère trop du volume de référence pour un alignement automatique, le logiciel **3DSlicer** permet de réaliser l'opération à la main en plaçant des points de repère. Aligner le volume sur un cerveau de référence permet d'une part de comparer plusieurs analyses entre elles dans un espace commun et d'autre part d'obtenir un contour du cerveau définissant la région d'intérêt. La région d'intérêt peut alternativement être précisée manuellement en traçant le contour de la zone d'intérêt pour chaque couche.

a).4 Analyse de Fourier par pixel Il est intéressant de réaliser certaines analyses directement sur les pixels de l'image. Cela permet d'obtenir des figures avec une bonne résolution et contourne le problème de la segmentation des neurones tout en profitant au mieux de l'échantillonnage permis par la caméra. Cependant, cette approche est coûteuse en calcul car elle opère sur un grand nombre d'éléments. Nous l'avons principalement réservée à l'analyse de Fourier pour une stimulation périodique. Pour chaque pixel dans la région d'intérêt, on applique la transformée de Fourier discrète sur son profil temporel (cf Fig. III.7 c.). Cela donne un pic en amplitude à la fréquence de stimulation et du bruit en dehors (cf Fig. III.7 d.). On calcule un rapport signal à bruit comme le rapport de l'amplitude du signal sur l'amplitude du bruit moyennée sur une fenêtre autour du pic de largeur arbitraire. On considère également la phase du pic, qui représente le déphasage dus du signal de fluorescence avec le stimulus. Ces valeurs pour chaque pixels sont ensuite utilisées pour représenter une couleur dans l'espace HSV (*Hue, Saturation, Value* soit Teinte, Saturation, Valeur). La teinte représente le déphasage, la saturation est réglée à 1, et la valeur représente le rapport signal à bruit.

a).5 Segmentation et analyse par neurone L'analyse par pixel est pertinente pour des études préliminaires simples car elle est gourmande en calcul, chaque section de neurone (environ 6 μm de diamètre) étant imagée sur environ 30 pixels (pixel objet de 0.8 μm de côté) (cf histogramme Fig. III.7 b.). En regroupant les pixels appartenant au même neurone, on peut réduire le volume de données à traiter tout en conservant leur qualité (cf Fig. III.7 b.). Il existe de nombreux algorithmes de segmentation, certains faisant appel aux données temporelles pour tirer profit de l'activité des neurones, d'autre opérant sur l'image moyenne. Nous nous avons pour l'instant uniquement utilisé l'algorithme de ligne de partage des eaux (*watershed*) combiné à une égalisation locale de contraste. Cela donne des résultats satisfaisants comme on le voit en figure III.7 (a.).

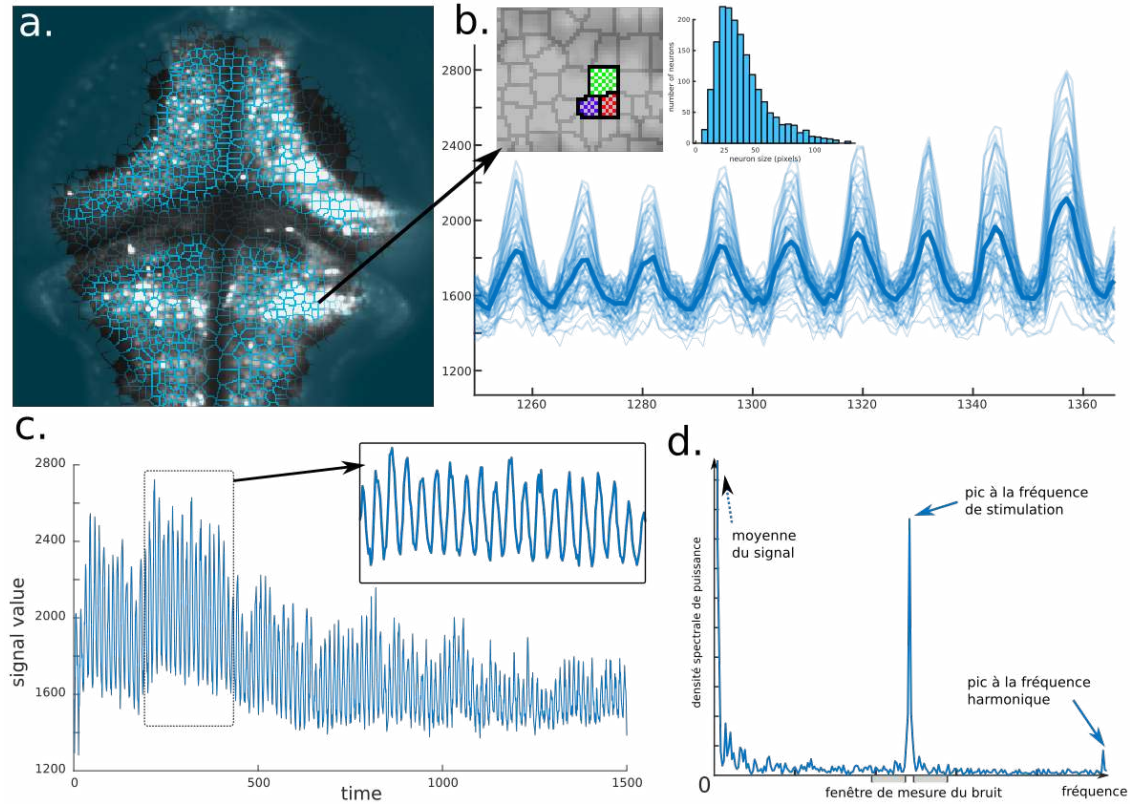


FIGURE III.7 – Illustration de différentes étapes de l'analyse.

a. Segmentation par l'algorithme *watershed* affichée par dessus une image moyenne.
 b. Détail de la segmentation. Un extrait du signal du neurone en vert est affiché dessous. Chaque trait léger correspond à un pixel du neurone, le trait épais correspond à la moyenne de tous les pixels pour ce neurone. L'histogramme montre la répartition des tailles des régions pour cette couche. La plupart des segments contiennent entre 20 et 50 pixels.
 c. Valeur de signal pour un pixel (le pixel en magenta sur le neurone vert) tout au long de l'enregistrement (le niveau de bruit de la caméra est à 400). Un détail sur la partie encadrée met en évidence son activité périodique.
 d. Détail de l'amplitude de la transformée de Fourier discrète du signal précédent. On voit un large pic à la fréquence de stimulation, largement au dessus du bruit évalué sur une fenêtre avoisinante.

Après segmentation, on définit la valeur d'un neurone comme la moyenne des valeurs des pixels qui le constituent. Chaque segment peut représenter une partie d'un neurone, plusieurs neurones, ou même une zone de l'image sans neurones, mais beaucoup de segments représentent un neurone. Pour environ 80 000 segments, cela réduit l'échantillon à 500 Mo, ce qui permet d'appliquer des algorithmes plus gourmands en ressources en un temps raisonnable.

b) Améliorations pratiques et techniques

b).1 Versionnage du code Le code utilisé pour l'analyse étant volumineux, sa gestion "génétique" (duplication et mutation) posait problème. J'ai donc mis en place un gestionnaire de version qui a permis d'unir les efforts de développement et de faciliter les mises à jour (correction de bugs, nouvelles fonctionnalités). Son utilisation a eu un effet positif sur la qualité du code, sa réutilisabilité, et sa prise en main.

b).2 Support matériel Lors de l'acquisition, **HCIImage** le logiciel édité par Hamamatsu pour l'utilisation de la caméra propose deux options. L'une consiste à enregistrer en mémoire vive les images au cours de l'enregistrement et à les exporter sur le disque à la fin, l'autre consiste à enregistrer un fichier de cache au format propriétaire dcimg directement sur le disque. Dans le premier cas, la vitesse d'enregistrement ne pose pas problème, mais la taille de la mémoire vive est limitée, ce qui ne convient pas pour de longues expériences. Dans le deuxième cas, la vitesse d'enregistrement est limitante pour des images volumineuses avec une fréquence élevée, un disque dur rotatif ne convient pas et nous avons donc utilisé un disque SSD.

b).3 Fichier de cache Initialement, ce fichier de cache était converti en une collection d'images au format tiff via HCIImage, qui étaient ensuite transférées sur le réseau interne depuis l'ordinateur d'acquisition vers l'ordinateur d'analyse pour enfin être traitées. Les programmes et systèmes de fichiers n'étant pas adaptés à la gestion de si nombreux fichiers, cela occasionnait un surcoût sur le temps de transfert et le temps de copie. Pour résoudre ce problème, nous sommes passés à l'utilisation directe du format dcimg. Après plusieurs tentatives infructueuses d'obtenir de la documentation auprès de l'entreprise Hamamatsu, nous avons opté pour une approche par rétroingénierie (d'autres implémentations plus complètes ont été développées par la suite comme par exemple **ce module dcimg pour python**).

b).4 Memory mapping Il n'est pas envisageable de charger un jeu de données de plus de 60 Go en mémoire vive, il faut donc ouvrir les données au moment de leur utilisation. Pour obtenir une tranche d'un pixel selon (t) sur des images individuelles, il est nécessaire d'ouvrir chacune des images. Le grand nombre d'opérations de fichiers requis peut être réduit en groupant plusieurs pixels, mais au prix d'une perte de simplicité qui rend le code difficile à gérer. La solution retenue est le memory mapping, qui permet de manipuler un fichier sur le disque comme un fichier en mémoire vive, entraînant un gain de simplicité et de performance. De plus, le memory mapping permet de travailler directement sur le fichier de cache, ce qui évite des copies supplémentaires coûteuses en espace et en temps.

Le memory mapping peut être combiné à l'allocation de mémoire disque pour être utilisé au moment de l'écriture. Cela facilite la manipulation des données par rapport à une écriture séquentielle dans un fichier binaire, et permet la modification d'une partie du fichier et la parallélisation de l'écriture. Pour cela, j'ai utilisé la fonction système `fallocate` qui alloue de l'espace sur un disque formaté en `ext4`.

b).5 Calcul du quantile glissant Une définition courante de la valeur de référence d'un signal calcique repose sur le calcul d'un quantile glissant (le huitième centile [36]). L'algorithme naïf qui consiste à calculer le quantile sur chaque fenêtre est inefficace ($\mathcal{O}(n^2)$), j'ai donc cherché une implémentation astucieuse et ai trouvé la fonction `runquantile` de la bibliothèque `caTools`, qui a apporté un gain en vitesse par rapport à l'implémentation précédente. Cette implémentation repose sur le tri par insertion mais retient le tri effectué sur la fenêtre précédente, ce qui lui permet d'atteindre une complexité en $\mathcal{O}(n \times k)$, où n est le nombre de valeurs et k la taille de la fenêtre.

c) Pistes d'améliorations

c).1 Ordre des dimensions L'ordre naturel des dimensions en mémoire est l'ordre obtenu lors de l'écriture $((x,y),z,t)$. Cet ordre permet de lire et écrire rapidement une image, mais n'est pas adapté à une tranche selon t . En effet les valeurs à deux instant successifs pour un même pixel (x,y,z) sont séparées en mémoire de 12 288 000 valeurs. Lire une tranche temporelle est extrêmement long sur un disque dur rotatif et reste limitant sur un SSD. Un gain de vitesse pour des tranches temporelles peut être obtenu en permutant l'ordre des dimensions en mémoire, au prix d'une perte pour la lecture d'images (tranche (x,y)). Pour un ordre (t,x,y,z) , la vitesse de lecture des images reste suffisamment rapide pour un affichage à fréquence vidéo tout en accélérant immensément la lecture de tranches temporelles, bien plus sollicitée lors de l'analyse. Réaliser ce changement nécessite une grande part de ré-écriture du code actuel et bénéficierait d'un langage plus adapté.

c).2 Réduction des données La taille des données brutes pourrait être largement réduite, ce qui accélérerait les copies et libérerait de l'espace disque. D'une part la dynamique des images n'exploite pas les 16 bits sur lesquels elles sont enregistrées, 12 bit suffiraient, ce qui entraînerait un gain immédiat de 25% sur la taille des fichiers. D'autre part, la région d'intérêt ne recouvre qu'une faible part du volume enregistré, opérer sur cette région seule entraînerait un gain de 50% environ.

c).3 Langage adapté Jusque là, une grande partie des données sont analysée en langage Matlab. Ce langage n'est pas très adapté à la gestion de données de ce type et souffre de plusieurs lacunes. Matlab est généralement lent, ce qui est handicapant. Matlab n'accepte de données que sur 8, 16, 32, ou 64 bits, ce qui interdit l'amélioration consistant à encoder les données sur 12 bits. Matlab est mauvais pour réaliser un système modulaire, ce qui augmente dramatiquement les efforts pour maintenir un programme. Matlab est fermé, opaque, et sous licence propriétaire, ce qui diminue les possibilités d'utilisation du code. J'ai réalisé un prototype rapide détaillé en annexe pour évaluer l'intérêt de traiter des données en langage Julia. Le principe d'interface, et spécifiquement des `AbstractArray`

([doc](#)) est particulièrement adapté à la manipulation de données matricielles en memory mapping, bien plus que le `memmapfile` de Matlab ([doc](#)) car il permet un traitement plus bas niveau tout en fournissant des abstraction plus haut niveau. Ces considérations m'ont conduit à penser que pour produire et maintenir une base de code saine et efficace pour l'analyse, il était indispensable de s'éloigner du langage Matlab, que le langage Python était une alternative possible, mais que le langage Julia était préférable. Ceci aussi bien pour une évolution à court, moyen et long terme.

III.3 Résultats

III.3.1 Carte de réponse en roulis et en tangage

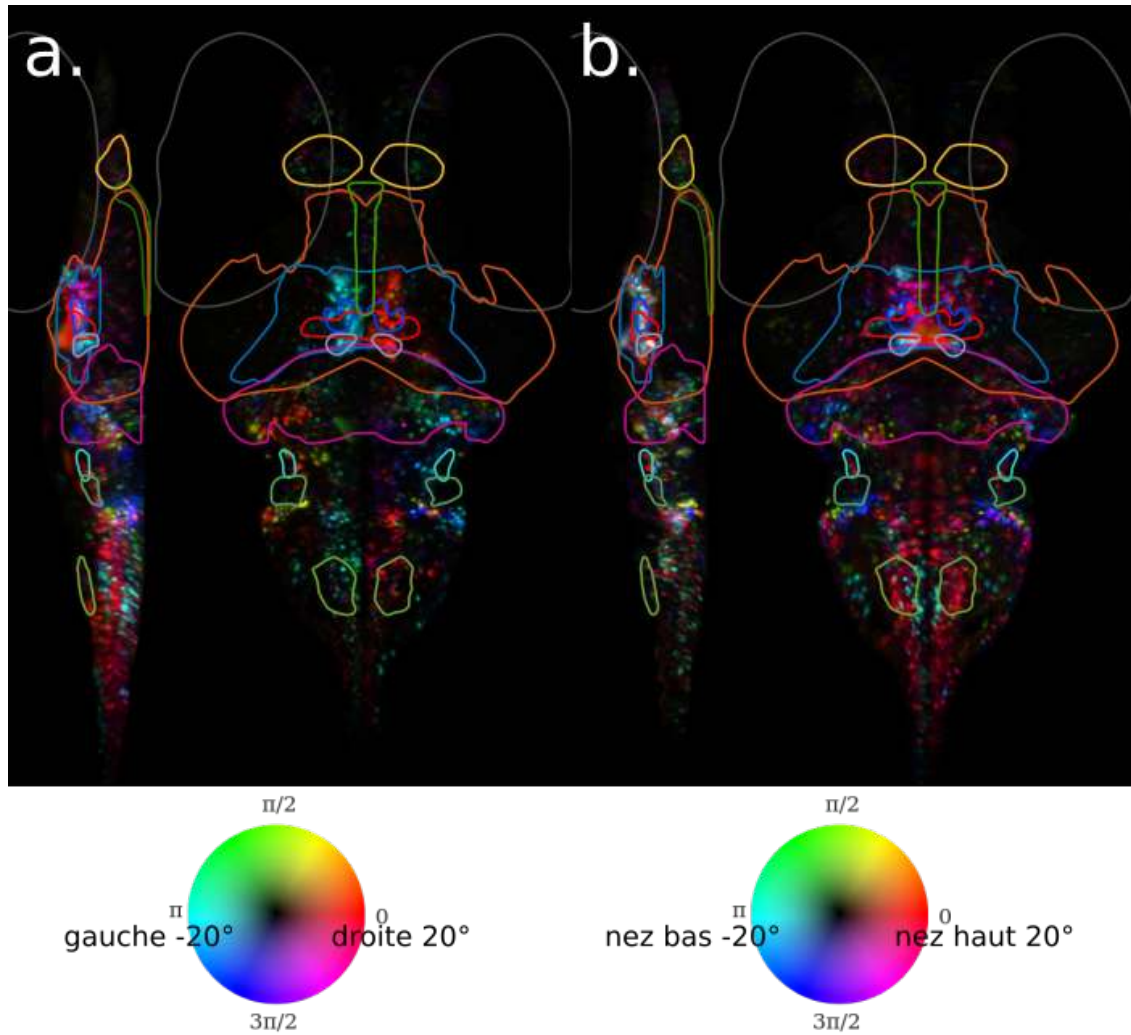


FIGURE III.8 – Cartes de réponses obtenues pour une stimulation de rotation sinusoidale selon l'axe de roulis (a) et de tangage (b). On remarque que la carte est antisymétrique dans le cas du roulis et symétrique dans le cas du tangage.

Chapitre IV

Microscope à feuille de lumière deux photons rotatif

Pour réaliser l'imagerie du cerveau lors du contrôle postural tel que présenté au chapitre II, il faut contrôler à la fois l'environnement visuel et l'environnement vestibulaire. Dans le chapitre III, je présente un microscope rotatif capable d'imager le fonctionnement du cerveau lors d'une stimulation vestibulaire réelle, ce qui répond en partie au problème. Dans ce chapitre, je m'intéresse à l'autre partie : comment réaliser l'imagerie tout en contrôlant l'environnement visuel, et cela en même temps qu'une stimulation vestibulaire.

Un microscope à feuille de lumière classique utilise un laser bleu pour stimuler la fluorescence, et cette longueur d'onde réside dans le domaine visible de la larve de poisson zèbre, ce qui peut l'éblouir et perturber son système visuel. Pour cette raison, Ahrens *et al*, pour l'étude de l'OMR, ont utilisé un microscope à deux photons classique [21]. Cela permet d'illuminer dans l'infrarouge, une longueur d'onde invisible pour le poisson. Cependant ils ne bénéficiaient pas des avantages d'un microscope à feuille de lumière et étaient contraints par le balayage point par point à réaliser l'acquisition du cerveau une région après l'autre afin de reconstruire *a posteriori* l'image du cerveau entier. À peu près en même temps, Truong *et al* publiaient un microscope à feuille de lumière deux photons permettant d'allier les avantages de la microscopie deux photons et de la microscopie à feuille de lumière [37].

Plus tard, Vladimirov *et al* [38] ont montré que l'étude de l'OMR était également possible en microscopie à feuille de lumière un photon, à condition de ne pas éclairer directement l'oeil du poisson. Ils ont utilisé deux feuilles de lumière, l'une éclairant le cerveau par le côté et l'autre par l'avant, entre les deux yeux. Cependant, l'OMR est un réflexe robuste qui ne recourt pas aux fonctions avancées de la vision, et la perturbation due à l'illumination des autres processus visuels n'est pas contrôlée. C'est pourquoi Wolf *et al* ont appliqué la technique mise au point par Truong à l'étude du système visuel de la larve de poisson zèbre [39]. Ils ont construit un microscope à feuille de lumière deux photons et réalisé l'acquisition du cerveau entier lors de stimulations visuelles.

Pour étudier le cerveau lors du contrôle postural, il est donc nécessaire de réaliser un microscope rotatif deux photons, ce qui soulève plusieurs enjeux techniques. D'une part, pour guider le laser deux photons vers une plateforme mobile, il faut disposer d'une

fibre adaptée (transmission de grandes puissances, faible dispersion, maintient de la polarisation, faible gain de courbure), d'autre part il faut minimiser les effets dus à la propagation d'un faisceau intense dans un fluide mobile. Ce chapitre débute sur les fibres optiques adaptées à la transmission d'un laser deux photons et leur utilisation en microscopie embarquée, et poursuit sur la construction d'un microscope deux photons rotatif fibré.

IV.1 Effet deux photons

IV.1.1 Principe

L'absorption deux photons est un phénomène non linéaire d'absorption simultanée de deux photons par une molécule ou un atome. Cet effet est proportionnel au carré de l'intensité lumineuse incidente et est lié au caractère anharmonique du dipôle oscillant. Pour cette raison, il est négligeable aux petites énergies mais devient important pour une intensité lumineuse élevée. On peut l'observer en concentrant fortement un faisceau puissant. La concentration peut être à la fois spatiale par focalisation et temporelle par impulsion temporelle.

IV.1.2 Concentration spatiale

Un système optique peut concentrer la lumière localement, ce qui produit un point de plus grande intensité, le point focal. Comme l'effet deux photons est proportionnel au carré de l'intensité, la zone concernée est d'autant plus restreinte. Cette propriété est utilisée en microscopie multiphoton pour produire une illumination ponctuelle qui permet le sectionnement optique dans la direction de propagation. En microscopie à feuille de lumière, au contraire, une illumination linéaire est recherchée. La focalisation est donc bien moindre et l'effet deux photons contribue à affiner la zone d'excitation (cf Fig. IV.1).

IV.1.3 Concentration temporelle

Une autre manière de concentrer la lumière est la concentration temporelle. Dans le cas d'un laser continu, la puissance est répartie sur toute la longueur de propagation du faisceau. En utilisant un laser pulsé, la puissance est concentrée en paquets beaucoup plus courts (cf Fig. IV.2). Par exemple, pour des impulsions de 100 fs, malgré la vitesse élevée de la lumière, la longueur de ces paquets est de 30 mm. Si de plus le taux de répétition du laser est de 80 MHz, la puissance moyenne d'une impulsion est 125 fois plus élevée qu'un laser continu de même puissance moyenne ($1/(100\text{fs} \times 80\text{MHz})$). L'effet deux photons étant proportionnel au carré de la puissance instantanée, on a intérêt à choisir les impulsions les plus courtes possibles (petit τ) et le taux de répétition le plus faible possible (grand T) pour un laser de puissance moyenne fixée [40]. Cette tendance est limitée par les photoperturbations induites, qui deviennent importantes au delà d'une centaines de nanojoules par impulsion. Les conditions optimales en microscopie par fluorescence à nappe laser deux photons sont donc autour de $f = 1 \text{ MHz}$, $\tau = 100 \text{ fs}$, $P = 100 \text{ mW}$.

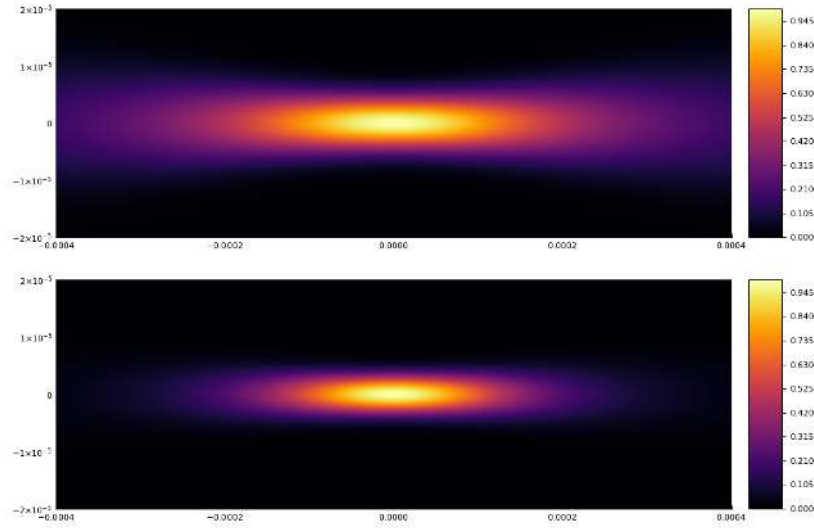


FIGURE IV.1 – Effet deux-photons en microscopie à feuille de lumière. Comparaison du profil d'intensité (haut) et de son carré (bas). On voit que la zone concernée par l'effet deux photons est restreinte. (paramètres : indice optique 1.33, longueur d'onde 915 nm, waist 6.5 μm)

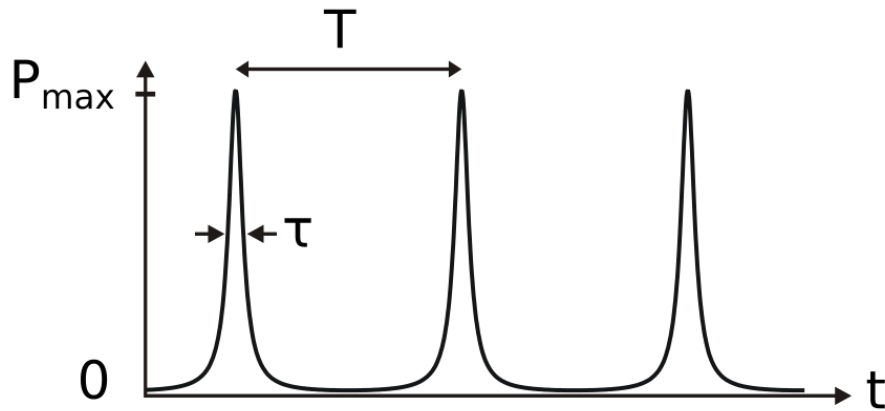


FIGURE IV.2 – Profil temporel de puissance d'un laser pulsé. Chaque impulsion a une durée τ , elles sont espacées d'une durée $T=1/f$. À puissance moyenne constante, plus τ est petit, et plus T est grand, plus P_{max} est grand. L'effet deux photons est proportionnel au carré de P_{max} .

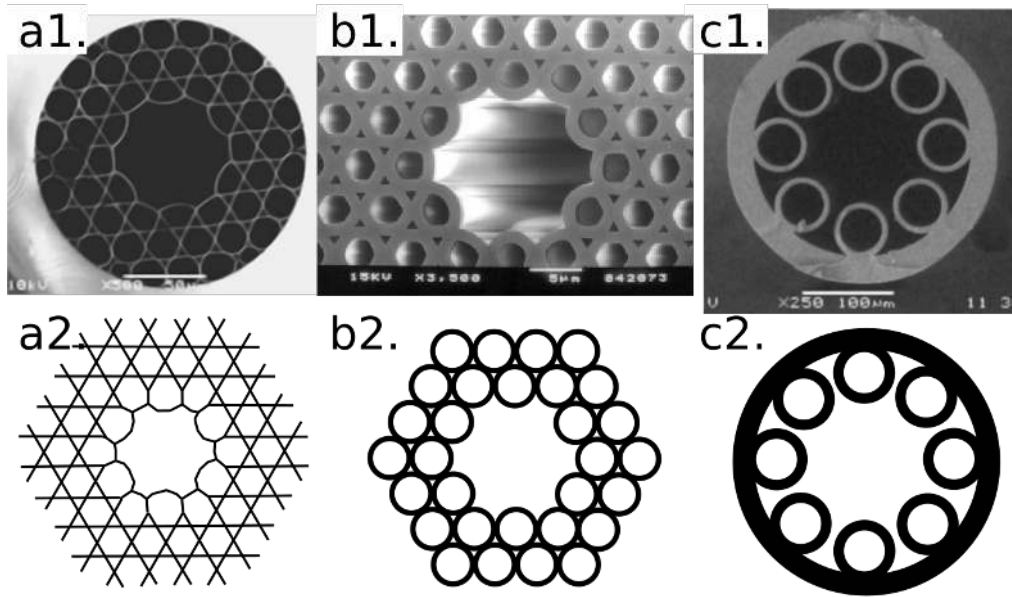


FIGURE IV.3 – Illustration de différents types de fibres évoquées.

a1. Fibre Kagomé (image extraite de Wang 2011 [41]), schéma du motif en a2.

b1. Fibre à réseaux de tube (image extraite de Cregan 1999 [42]), schéma du réseau tubulaire comme dans Vincetti 2010 [43] en b2.

c1. Fibre à courbure négative (image extraite de Yu 2016 [44]), schéma en c2. Voir également Pryamikov *et al* [45]

IV.2 Fibre optique, principe et état de l'art

IV.2.1 Guide d'onde

Dans un cadre général, un guide d'onde est un objet qui contraint la propagation d'une onde par ses propriétés physiques. Dans le domaine des ondes électromagnétiques aux fréquences radio, par exemple, un tuyau en métal permet de confiner l'onde et de contraindre une propagation unidimensionnelle sur de longues distances [46], mais également un milieu diélectrique [47]. On peut lire une revue sur l'histoire de ces découvertes [48]. Dans le domaine des fréquences optiques, les guides d'ondes à saut d'indice sont une famille dans laquelle on trouve un grand nombre des fibres optiques utilisée en télécommunications [49]. Ces fibres sont constituées d'un coeur de verre entouré d'une gaine d'indice optique plus petit. Dans le cadre de l'optique géométrique, on décrit le guidage par le phénomène de réflexion totale sur le dioptre pour une réfraction en dessus de l'angle limite. Dans le cadre de l'optique ondulatoire, on peut définir les modes propres de la cavité optique. Une fibre est dite monomode si seul le mode fondamental peut se s'y propager.

IV.2.2 Fibre optique monomode à saut d'indice

Une fibre optique monomode avec un mode propre quasiment gaussien est adaptée à la transmission d'un faisceau gaussien [50]. C'est le genre de fibre que l'on utilise pour guider

le laser d'excitation dans le modèle un photon du microscope à feuille de lumière [33]. Si l'on tente de transmettre un faisceau pulsé dans ces fibres, on se heurte au phénomène de dispersion [51] [52]. La largeur spectrale d'un laser pulsé est d'autant plus grande que l'impulsion est courte et la durée de l'impulsion réside dans la synchronicité des différentes fréquences. Dans un milieu dispersif, les différentes longueurs d'onde se propagent à une vitesse différente, ce qui désynchronise les oscillations et élargit le pic. L'effet deux photons étant proportionnel au carré de la puissance instantanée, il est fortement dégradé par l'élargissement du pic.

Une solution consiste à précompenser cette dispersion via des éléments optiques comme une suite de prismes ou de réseaux de diffraction positionnés en amont de l'injection [53]. Cette solution permet de réduire la largeur temporelle du pic en sortie de fibre, et donc de conserver l'effet deux photons. On rencontre un autre obstacle pour des impulsions de haute énergie. C'est l'automodulation de phase par effet Kerr [54]. Cet effet est lié aux propriétés non linéaires du milieu traversé, qui change d'indice en fonction de l'intensité lumineuse qui le parcourt. Il en résulte également un élargissement de l'impulsion. Cet effet apparaît pour des puissances moyennes relativement faibles (10 mw [55]), ce qui empêche d'utiliser des impulsions optimalement courtes (<1 ps [55]) avec de telles fibres. Des techniques existent pour précompenser cette distorsion [56] [57], mais elles sont peu répandues car difficiles à mettre en place [55]. De plus, ces problèmes peuvent être contournés par les fibres à âme vide.

IV.2.3 Fibre à âme vide

Les phénomènes de dispersion et de non-linéarité sont dus à l'interaction avec la matière. Pour les contourner, il faut donc que les impulsions à haute énergie se propagent dans le vide. L'effet de réflexion totale sur le dioptre coeur/enveloppe ne peut plus être utilisé, car il faudrait un milieu d'indice plus petit que 1, c'est à dire dans lequel la lumière se propage plus vite que dans le vide, ce qui n'est pas possible. Intéressons-nous au guide d'ondes creux.

a) Guide d'onde métallique ou diélectrique

Une idée pour confiner la lumière dans un guide unidimensionnel est d'utiliser le phénomène de réflexion métallique, comme sur un miroir. En 1964, un article s'intéresse aux guides d'ondes dans le contexte des télécommunications optiques à longue distance [58]. Les solutions qui semblaient les plus prometteuses à l'époque consistaient soit en une séquence de lentilles et de miroirs, soit en un tuyau métallique ou diélectrique. Le guide d'onde creux circulaire suscite un intérêt pour sa simplicité et sa bonne transmission sur de très longues distances, mais l'article montre que les pertes augmentent très rapidement avec la courbure de la trajectoire.

b) Fibres à cristaux photoniques

Une autre idée consiste à utiliser un phénomène de réflexion par interférences comme le miroir de Bragg. Un tel miroir est constitué d'une succession périodique de couches d'indice différents et permet d'obtenir une réflexion quasi totale à la longueur d'onde du motif.

b).1 Fibres à réseaux de tubes On trouve ce genre de réseau pour la première fois en 1999 sous forme de fibre à cristaux photoniques [42] ou plus tard sous la forme de fibre microstructurées [59]. En 2010, Vincetti *et al* montrent par analyse numérique que seule la première couche de tubes joue un rôle important dans les propriétés de ces fibres [43]. Ce qui donne des fibres constituées d'un seul réseau de tube.

b).2 Fibres à motif Kagomé L'idée du réseau de diffraction a également donné lieu aux fibres à réseau trihexagonal, ou "Kagomé". De telles fibres ont été construites pour la première fois en 2002 sous le nom de fibre à cristaux photoniques. Le gain était alors de l'ordre de 2 dB/m [60]. En 2011, un gain de 180 dB/km a été obtenu avec de telles fibres [41]. Cependant, en 2010, Février *et al* montrent par analyse numérique que les propriétés de ces fibres ne reposent pas tant vers le motif périodique que sur la forme du coeur [61], ce qui ouvre la voie vers les fibres à coeur hypocycloïde.

c) Fibres à courbure négative

Les idées de fibre à réseau de tubes unique et de fibres à coeur hypocycloïde se rejoignent dans un même concept : les fibres à courbures négatives. En 2016, Yu et Knight publient une revue sur l'histoire de ces fibres et leurs mécanismes [44]. Ils commentent entre autres l'atténuation, les bandes de transmission et le gain de courbure. Ces critères rendent cette famille de fibres particulièrement adaptée à notre application. En effet, les larges bandes de transmission permettent de guider plusieurs longueurs d'onde, aussi bien pour l'imagerie un photon que deux photons, la faible atténuation permet de conserver la puissance du laser nécessaire à l'effet deux photons, et le faible gain de courbure permet de conserver une illumination stable pendant la rotation du microscope.

IV.2.4 Utilisation des fibres optiques en microscopie embarquée

Les propriétés de guidage de la lumière d'une fibre optique lui permettent d'alléger considérablement ou de déporter certaines parties des microscopes pour les rendre compatibles avec l'imagerie embarquée. Un microscope est en effet composé d'un axe d'illumination, d'un échantillon, et d'un axe de détection. Les axes peuvent être séparés dans différents bras ou réunis sur une portion du montage optique et sont généralement composés d'éléments optiques rigides passifs tels que des objectifs, miroirs, filtres... Ces différentes parties parfois très volumineuses peuvent être remplacées ou déportées à l'aide de fibres optiques. Nous allons voir par la suite plusieurs types de microscopes embarqués utilisant une fibre optique.

a) Imagerie sur rongeur à tête fixée

Une méthode répandue en imagerie cérébrale sur rongeur est de fixer un animal sous un microscope classique immobile. Le cerveau est rendu accessible par une opération chirurgicale pendant laquelle le crâne est retiré localement et remplacé par une vitre. Le fait d'immobiliser la tête pendant l'imagerie peut limiter le répertoire comportemental et constituer une gêne pour l'animal. Une solution est un système où le rat se positionne volontairement sous le microscope [67], une autre est le système en réalité virtuelle. Dans cette deuxième solution, le rongeur marche sur une boule en polystyrène sur coussins d'air

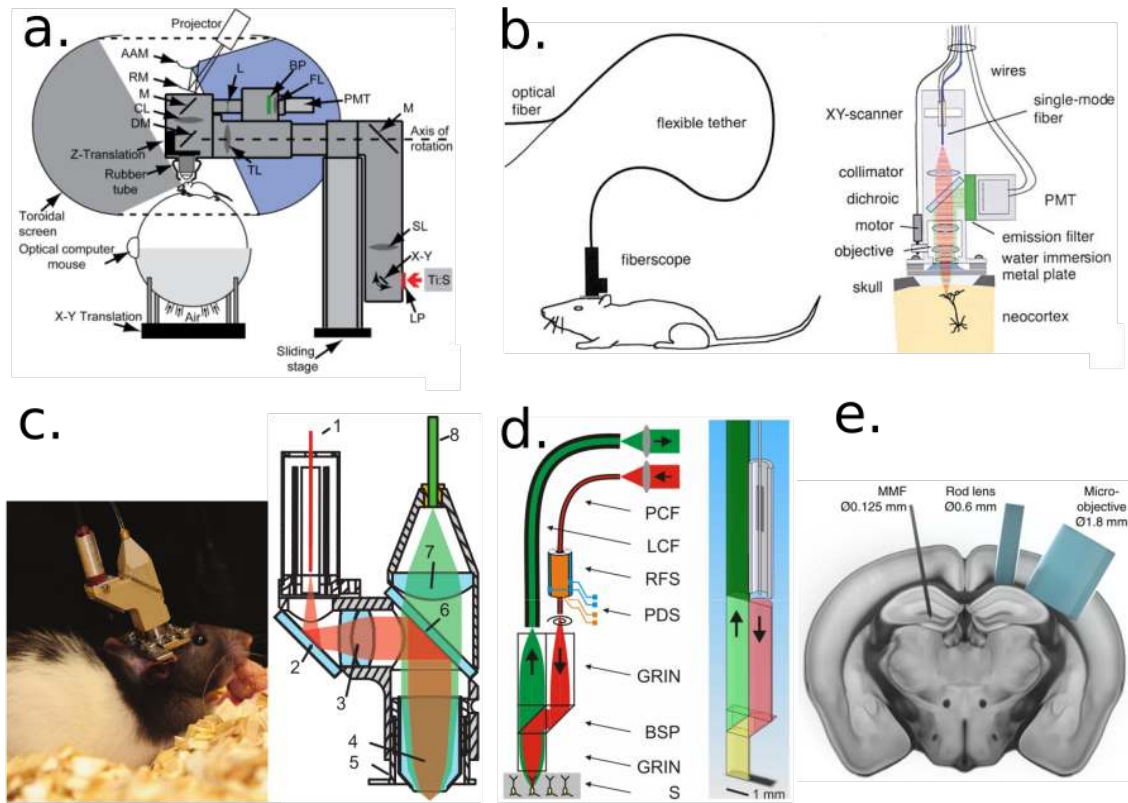


FIGURE IV.4 – Différentes techniques de microscopie en imagerie neuronale fonctionnelle chez le rongeur.

a. Un microscope deux photons statique réalise l'imagerie du cerveau d'une souris lors d'une expérience en réalité virtuelle [62].

b. Un microscope deux photons est fixé sur la boîte crânienne d'un rat. Le laser est guidé à travers une fibre à cœur de verre dont la dispersion est précompensée. L'unité de détection est intégrée au microscope [63].

c. Un microscope deux photon est fixé sur le crâne d'un rat, mais l'unité de détection est externe, la lumière étant collectée par une fibre [64].

d. Un fibroscope deux photons utilise des fibres à gradient d'indice comme lentilles pour réduire l'encombrement. Le laser est guidé au moyen d'une fibre à cristaux photoniques et la lumière est collectée par une fibre à large cœur [65].

e. Un endoscope sans optique permet de réduire considérablement l'encombrement et d'atteindre des régions plus profondes du cerveau, mais nécessite une calibration préalable [66].

alors qu'un environnement visuel est projeté sur un écran autour de lui [62]. Le microscope est ici entièrement statique et rigide. La réalité virtuelle a également été utilisée avec des enregistrements en électrophysiologie [68][69].

b) Déportation de l'illumination

Une pièce particulièrement volumineuse dans les microscopes multiphotons utilisée pour l'imagerie neuronale est le laser pulsé. En effet, ces systèmes dépendent de beaucoup d'éléments optiques et d'une stabilité thermique et mécanique poussée. Pour construire des microscopes embarqués, il est donc nécessaire de guider le laser depuis la source jusqu'à l'échantillon, ce qui est réalisé à l'aide de fibre optique. Il est possible d'utiliser une fibre optique monomode à cœur de verre [63] [64] [70] à condition de précompenser la dispersion pour conserver une impulsion suffisamment courte pour produire l'effet non linéaire recherché, ce qui est réalisé avec une paire de réseaux de diffraction. Une alternative est d'utiliser une fibre à cœur creux [71] [72] [73] [74]. La partie de détection est quant à elle également embarquée. On peut avoir un simple photomultiplicateur/photodiode pour l'imagerie par balayage [63] ou un capteur CMOS pour une imagerie en champ plein [75].

c) Déportation de l'illumination et de la détection

Dans les exemples précédents, le laser est amené par une fibre, mais le capteur est sur place, le signal repartant sous forme de signal électrique. Il est également possible de déporter le système de détection en collectant la lumière par fibre optique. Certains utilisent pour cela une fibre multimode [73] [64], d'autres une "fibre plastique" [74], d'autres encore un faisceau de fibres [70]. Dans ce cas, la lumière collectée est mesurée en sortie de fibre à l'aide d'un système optique adapté sans limite d'encombrement. On peut ainsi utiliser des systèmes régulés en température ou munis d'une électronique complexe.

d) Lentilles à gradient d'indice

Malgré la déportation de l'illumination et de la détection, les systèmes optiques restent encore assez volumineux du fait des composants utilisés et des éléments mécaniques nécessaires. Une possibilité pour pousser la miniaturisation encore plus loin est d'utiliser des fibres à gradient d'indice (*GRIN lens*, *GRAdient INdex lens*). Ces fibres sont constituées d'un milieu à gradient d'indice qui leur donne des propriétés similaires à des lentilles mais sont plus fines et ne nécessitent pas d'éléments mécaniques. Cela permet d'obtenir des microscopes ultra-compacts portables et de poids très réduit [76][65].

e) Microendoscopes

D'autres techniques d'imagerie neuronale se passent même d'optique et sont uniquement constituées d'une fibre insérée dans l'échantillon. On parle alors plutôt de microendoscope. L'idée générale est d'utiliser la même fibre pour éclairer l'échantillon et collecter la lumière. Des éléments actifs peuvent être utilisés pour moduler le front d'onde, et plusieurs techniques reposent sur une phase de calibration préalable [77][78][66]. Ces techniques utilisent des fibres optiques multimodes classiques. L'avantage de l'endoscopie est que les tissus sont traversés par la fibre, et pas directement par la lumière, ce qui

contourne le phénomène de dispersion. Il existe également des systèmes plus sophistiqués qui combinent plusieurs fibres en une seule de manière à profiter de propriétés différentes pour l'émission et collection de lumière [79][80][81].

IV.3 Caractérisation et utilisation de fibres à âme vide

Nous avons vu dans la partie précédente qu'une fibre optique permet de guider la lumière, que ce soit pour éclairer l'échantillon ou collecter le signal. Les fibres de verre conviennent bien aux applications classiques, mais posent des problèmes d'interaction lumière-matière lors de la transmission d'impulsions à haute énergie pour la microscopie multiphoton et nécessitent une précompensation de la dispersion. Les fibres à âme vide permettent de contourner ces problèmes et ont déjà été largement utilisées dans des microscopes embarqués sur rongeur [71] [76] [65] [73] [72] [74]. C'est donc vers celles-ci que nous nous sommes tournés. Aucune fibre optique répondant à nos besoins n'étant disponible commercialement, nous nous sommes tournés vers l'entreprise **Glophotonics** et avons testé plusieurs modèles.

IV.3.1 Comparaison de fibres

Au début, nous avons utilisé des fibres ayant une bande de transmission uniquement dans l'infrarouge. Ces fibres ont permis de réaliser l'acquisition deux photons de l'activité neuronale lors de stimulation vestibulaire. Ensuite, nous avons cherché à permettre à la fois la transmission d'un laser 1P et 2P, d'où l'utilisation de fibres avec plusieurs bandes de transmission. Parmi ces fibres, nous avons retenu le modèle PMC-C-9005 B2 qui permet une bonne transmission (97% à 930 nm sur 1,5 m de fibre contre 70% pour PMC-C-1C-R&D2). J'utilise ce modèle comme référence par la suite.

IV.3.2 Injection d'un laser dans une fibre

Une fibre capable de guider à la fois un laser 1P et un laser 2P permettrait de réaliser l'acquisition du cerveau en changeant facilement la longueur d'onde d'excitation. Cela permettrait de mettre en évidence les différences dans l'activité neuronale causées par l'environnement visuel. Je décris ici le processus d'injection dans une fibre et le montage que j'ai mis en place pour passer du laser 1P au laser 2P à l'aide d'un miroir amovible.

a) Principe

Pour injecter le laser dans la fibre, il faut aligner tous les éléments dans l'axe optique et régler finement les degrés de liberté en translation et en rotation. De plus, comme on souhaite un couplage monomode, il faut faire coïncider le mode laser d'entrée de fibre avec le mode propre de la fibre. Le laser ayant une largeur initiale de D , il faut le ramener à une largeur de fibre w ($23 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$ d'après la documentation). Pour cela, il faut utiliser une lentille de focale f et satisfaire l'équation suivante :

$$f = D \frac{\pi w}{4\lambda}$$

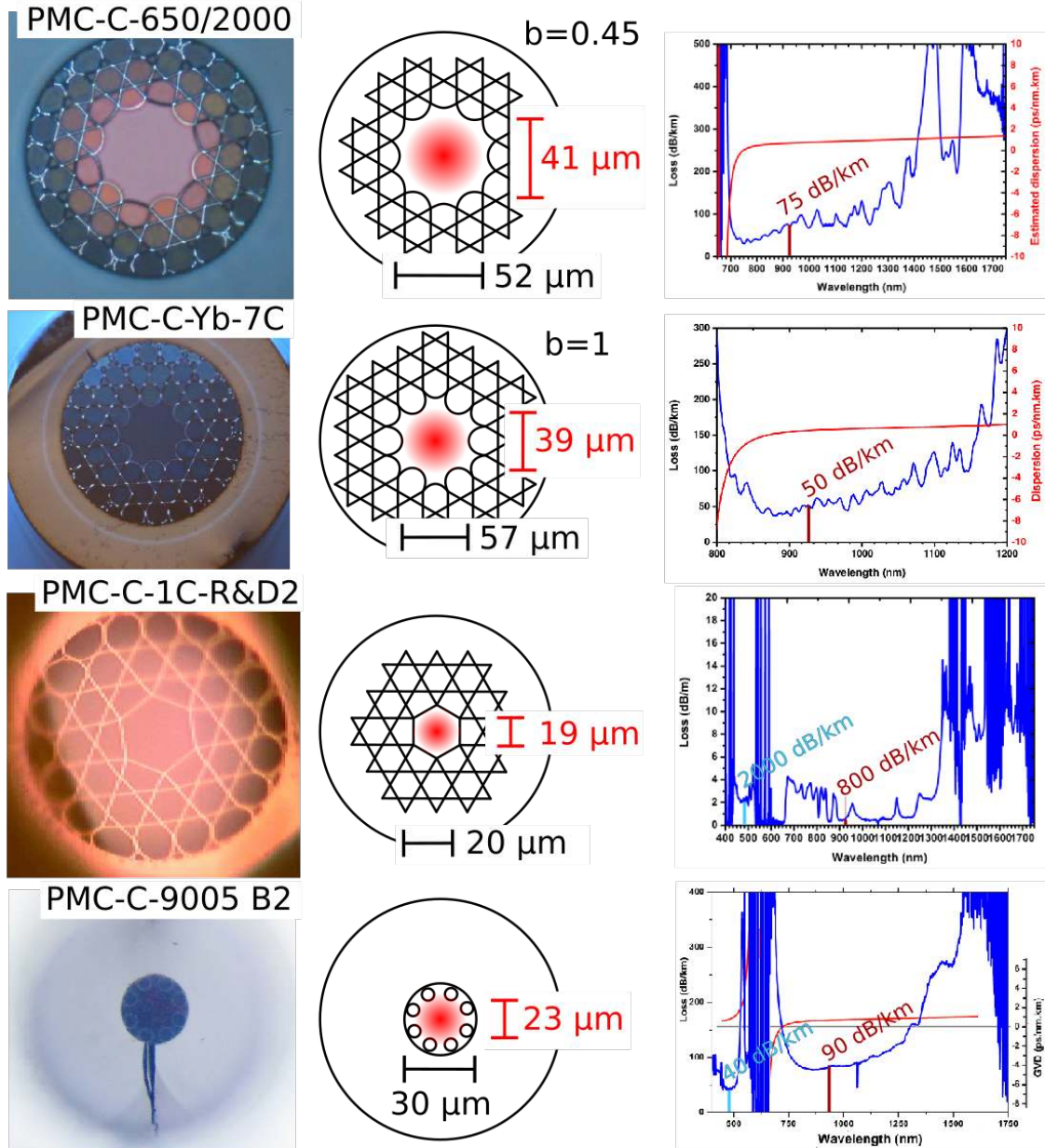


FIGURE IV.5 – Comparaison de plusieurs fibres fournies par Glophotonics. Les schémas représentent la largeur du coeur (en noir) et la largeur du mode propre (en rouge). Dans le spectre de transmission, on s'intéresse à la valeur à 930 nm et à 488 nm si possible. La valeur de la dispersion est toujours la même, environ à 1 ps/nm.km . Les trois premières fibres ont un motif de Kagomé, alors que la dernière n'est composée que d'une couche de capillaires. Seule la troisième fibre a un coeur hexagonal, les autres ont un coeur hypocycloïde. La valeur du paramètre de courbure est notée b , comme défini dans Debord *et al.*

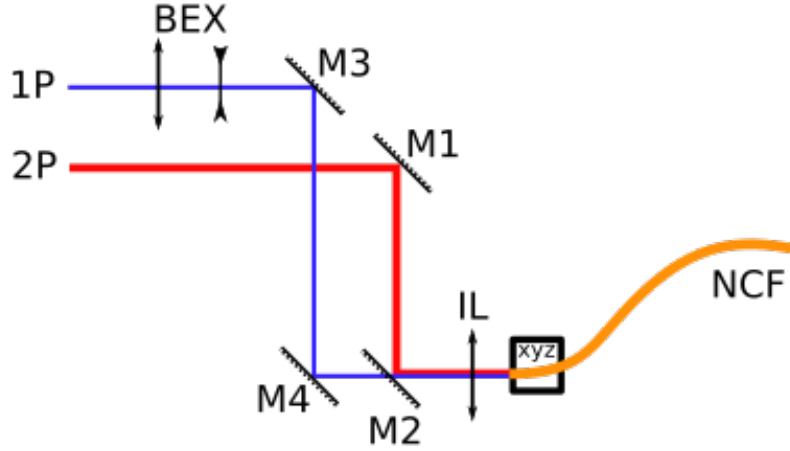


FIGURE IV.6 – schéma de l'injection à deux lasers dans la fibre. Le miroir M2 est amovible et permet de basculer entre l'injection 1P et 2P. (BEX = *Beam Expander*, IL = *Injection Lens*, NCF = *Negative Curvature Fiber*)

Pour la première étape, on injecte un laser visible par l'autre extrémité de la fibre et l'on joue sur les miroirs M1 et M2 pour pointer vers la sortie du laser 2P.

b) Injection 2P

Le laser "Mai-Tai" que j'ai utilisé délivre un faisceau quasiment gaussien ($M^2 < 1.1$) et son waist (w_0) est large d'environ 1 mm. Ces valeurs sont données par la documentation pour une utilisation à 800 nm, mais elles peuvent évoluer légèrement en accordant la longueur d'onde de fonctionnement. La largeur d'un faisceau gaussien au long de sa propagation (z) est définie par :

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \quad \text{avec} \quad z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$$

Le diamètre du laser est donc d'environ 2 mm après un mètre de propagation. En prenant $D = 2$ mm, $\omega = 23$ μm , et à $\lambda = 915$ nm, on trouve donc $f = 40$ mm, c'est pourquoi j'ai utilisé une lentille de focale 40 mm (référence Thorlabs AC254-040-B-ML). Cette lentille dispose également d'un traitement de surface pour optimiser la transmission dans l'infrarouge.

J'ai fixé une extrémité de la fibre sur une platine de translation xyz à 40 mm de la lentille (Fig. IV.6). Pour faciliter l'alignement, j'ai tout d'abord injecté un laser visible grâce à un connecteur fibre à fibre dans l'autre extrémité. Cela m'a permis de pré-aligner deux miroirs sur support rotatifs en visant l'orifice du laser parallèlement à l'axe optique. En allumant le laser à faible puissance pour ne pas endommager la fibre, on obtient alors facilement une transmission suffisante pour pouvoir mesurer la puissance en sortie de fibre. À partir de cette étape, il suffit d'optimiser la puissance transmise en jouant sur les réglages. Dans un premier temps, les deux degrés de rotations de chacun des deux miroirs, et dans un deuxième temps, les deux degrés de rotation du second miroir et les trois degrés de translation de la platine. Cette technique permet d'obtenir en un temps raisonnable (~ 1 h) une transmission optimale ($\sim 96\%$).

c) Injection combinée 2P + 1P

Pour injecter un deuxième laser, il faut à nouveau faire coïncider le mode de la fibre avec celui du laser, mais en conservant la même lentille d'injection et sans utiliser la platine de translation. Il faut donc adapter la largeur du faisceau à l'aide d'un télescope ou *beam expander* (BEX). En remplaçant 915 nm par 488 nm, on obtient $D = 1$ mm. La lentille étant optimisée pour l'infrarouge, sa transmission dans le bleu n'est que de 50%, mais la puissance du laser bleu est suffisante pour compenser cette perte. Par contre, la fibre n'est pas tout à fait monomode à cette longueur d'onde, et l'on distingue clairement en sortie le mode TEM11 ou les modes TEM10 / TEM01 en fonction de la position de la fibre. La meilleure transmission obtenue est de l'ordre de 50%, mais cela est suffisant pour l'imagerie statique (fibre immobile).

IV.3.3 Propriétés**a) Dispersion et pré-compensation**

Un paramètre important pour la transmission d'un laser pulsé est la dispersion. C'est celui qui nous force à utiliser des fibre à cœur creux et qui permet de conserver une impulsion aussi courte que possible. Mais la dispersion d'une fibre à cœur creux n'est pas nulle, elle est de l'ordre de 1 ps/nm/km (élargissement temporel / largeur spectrale / distance parcourue) comme on peut le voir sur la courbe. La largeur spectrale d'une impulsion est donnée par

$$\Delta\lambda_t = \frac{\lambda^2}{c\Delta t}$$

et vaut donc 28 nm. Pour une impulsion de 100 fs à 915 nm, cela donne un élargissement de l'ordre de 28 fs au bout d'un mètre de propagation dans la fibre, soit une perte de concentration de 30% et donc une perte d'effet deux photons de 50%. Heureusement, il est possible de pré-compenser cette dispersion à l'aide d'un système optique placé en amont de la fibre. Le laser "Mai-Tai" est justement accompagné d'un élément "Deepsee" qui permet une telle précompensation réglable de -8 900 à -24 500 fs² d'après la documentation.

En mesurant la durée de l'impulsion en sortie de fibre à l'aide d'un autocorrélateur, on confirme que la précompensation permet de retrouver une impulsion de 100 fs dans l'échantillon.

b) Gain de courbure

Les propriétés de transmission de la fibre peuvent varier avec la courbure de celle-ci. La transmission est généralement optimale pour une fibre droite et se détériore suivant le rayon de courbure avec des pertes mesurées en dB. Une fibre PCNC-FC-K13-001 que je ne présente pas ici donnait des variations de transmission de l'ordre de 20% pour un rayon de courbure de 5 cm. Lors d'une expérience, la rotation du microscope engendre des déformations de la fibre, et donc des variations de transmission. L'éclairage incident se retrouve corrélé à la stimulation, ce qui crée un signal parasite. Un signal parasite supérieur à 1% détériore trop le rapport signal à bruit et empêche l'analyse des données.

On cherche donc à caractériser les pertes de transmission liées à la courbure. Pour cela, il suffit de placer un puissance-mètre en sortie de fibre et de faire varier la courbure.

Des modèles numériques [82] [44] [83] suggèrent que le gain évolue de manière inversement proportionnelle au carré du rayon de courbure. Cette relation est également observée sur notre fibre. Les pertes par mètre de fibre courbée restent cependant petites même pour un rayon assez court. Elles valent 0.1 dB ($\sim 2\%$) pour un rayon de courbure de 7 cm.

En conditions réelles, on peut s'arranger pour limiter la courbure et répartir les déformations sur l'ensemble de la fibre. Par exemple, la fibre peut être placée le long d'une tige de rigidité plus élevée. Lors du déplacement d'une extrémité, une portion droite de 1 m de fibre se trouve courbée avec un rayon de 20 cm, ce qui donne des pertes de 0.01 dB, soit 0.2%.

c) Polarisation

On voit dans la section précédente que la courbure a un effet sur la transmission négligeable dans le contexte de l'imagerie. Cependant, un autre aspect peut influencer la quantité de lumière détectée : la polarisation. La sensibilité à la polarisation dépend de la configuration d'éclairage (parallèle ou orthogonale), du type d'absorption (un ou deux photons), et du comportement de la fibre en réponse à une courbure.

c).1 Direction d'illumination Un fluorophore peut être modélisé par un dipole électrostatique. La fluorescence consiste en l'absorption d'un photon incident et la ré-émission d'un photon de fluorescence selon les lois du rayonnement dipolaire électrique. Ce phénomène est anisotrope, il dépend de l'angle entre le vecteur de polarisation et le moment dipolaire. Quand l'axe d'excitation est parallèle à l'axe d'observation (par exemple en microscopie confocale ou deux photons classique), le plan de polarisation est orthogonal aux deux, un photon absorbé est donc réémis dans la même direction quelle que soit la polarisation (cf Fig IV.8 a.). Au contraire, quand l'axe d'excitation est orthogonal à l'axe d'observation (par exemple en microscopie à feuille de lumière), l'angle de polarisation influe sur la direction d'émission (cf Fig IV.8 b.). Pour une polarisation linéaire orthogonale à l'axe d'observation ($\alpha=0$), on se retrouve dans un cas similaire au précédent, mais pour une polarisation linéaire qui contient l'axe d'observation ($\alpha=90^\circ$), on obtient une diminution du signal de fluorescence dans l'axe d'observation. On confirme ceci à l'aide d'un lame $\lambda/2$. En tournant une polarisation linéaire et en observant la fluorescence du cerveau, on passe d'une intensité détectée maximale (100%) à une intensité minimale (50%) [84].

c).2 Absorption deux photons En excitation deux photons, l'état de polarisation influe sur l'efficacité d'absorption. Un faisceau polarisé linéairement a un taux d'absorption deux photons plus élevé qu'un faisceau polarisé circulairement. Cependant, un faisceau polarisé circulairement conduit à une excitation plus homogène du fluorophore [84]. Le résultat est qu'une polarisation circulaire conduit à un signal détecté deux fois plus faible qu'une polarisation linéaire optimale, et de l'ordre d'une polarisation linéaire à 90° . Idéalement, la polarisation en sortie de fibre doit donc rester linéaire et horizontale quelle que soit sa déformation. J'ai donc cherché à caractériser les modifications de polarisation induites par une déformation de la fibre.

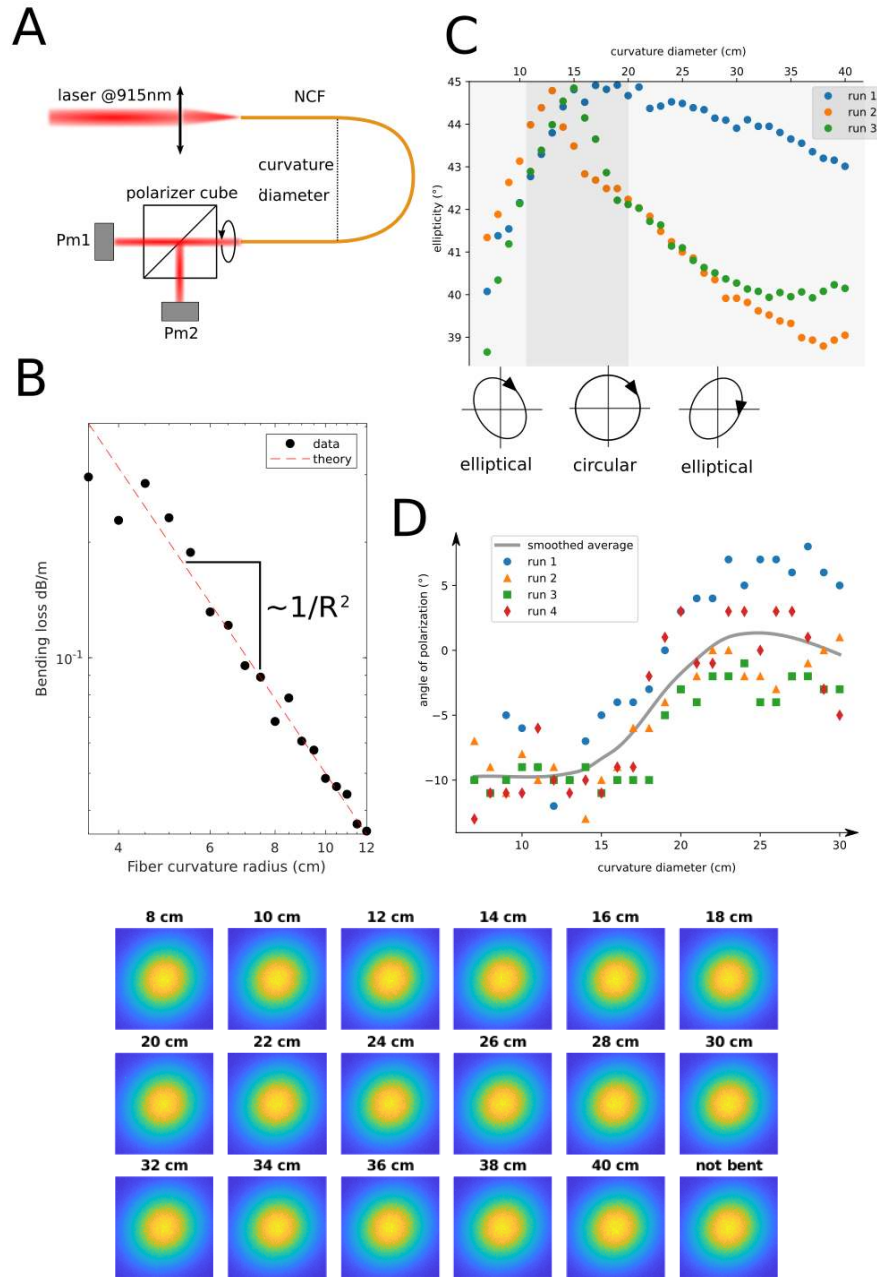


FIGURE IV.7 – Propriétés de la fibre lors d'une courbure.

A. schéma du setup de caractérisation

B. gain en fonction de la courbure

C. ellipticité en fonction de la courbure (quasi circulaire)

D. angle de polarisation en fonction de la courbure (quasi linéaire)

Au dessous figure le profil en sortie de fibre pour différentes courbures. Il n'est pas affecté.

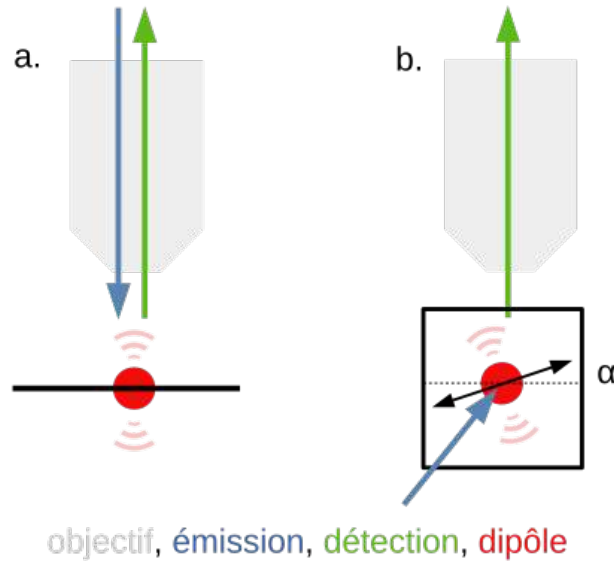


FIGURE IV.8 – a. Comme dans un microscope deux photons classique, la direction d’émission et de détection sont alignées, et la polarisation est dans le plan orthogonal. Quelle que soit la polarisation, la lumière détectée est toujours la même.

b. Dans un microscope à feuille de lumière, la direction d’émission est dans le plan orthogonal à la détection. La direction de polarisation fait alors un angle α avec la direction de détection. Pour $\alpha = 90^\circ$, la lumière détectée est maximale, mais pour $\alpha = 0^\circ$, elle est nulle.

c).3 Caractérisation des effets sur la polarisation Une déformation de la fibre peut entraîner deux modifications sur la polarisation : une rotation et un changement d’ellipticité. Pour les mesurer, j’ai placé un cube polariseur en sortie de fibre équipé d’un puissance-mètre sur chaque bras. Pour chaque position de la fibre, j’ai tourné le cube de manière à minimiser la puissance mesurée sur un bras (et donc maximiser la puissance sur l’autre bras). Cela permet de déduire l’orientation de la polarisation (angle du cube) et son ellipticité (valeur du grand axe et petit axe). L’ellipticité (θ) est définie par $\tan(\theta) = \frac{b}{a}$ où (a) est le grand axe et (b) le petit axe de l’ellipse. J’ai positionné la fibre en forme de U et ai réalisé des mesures pour des diamètres allant de 5 cm à 40 cm (cf Fig. IV.7).

c).4 Rotation de la polarisation J’ai montré que la polarisation tournait largement en fonction de la courbure de la fibre. Par exemple, entre un rayon de courbure de 15 cm et 25 cm, une polarisation linéaire peut tourner de 10° (variation du signal de $\sim 5\%$). Ces valeurs de courbure sont celles qu’on peut attendre dans de bonnes conditions expérimentales, c’est pourquoi j’ai cherché à obtenir une polarisation invariante par rotation, c’est-à-dire une polarisation circulaire.

c).5 Changement d’ellipticité En polarisation circulaire ($\theta = 45^\circ$), la rotation n’est plus un problème, mais la fibre peut toujours transformer la polarisation circulaire en une polarisation elliptique, qui perd sa symétrie et devient donc sensible à la rotation. J’ai caractérisé la variation d’ellipticité dans le cas d’une polarisation circulaire. Les plus

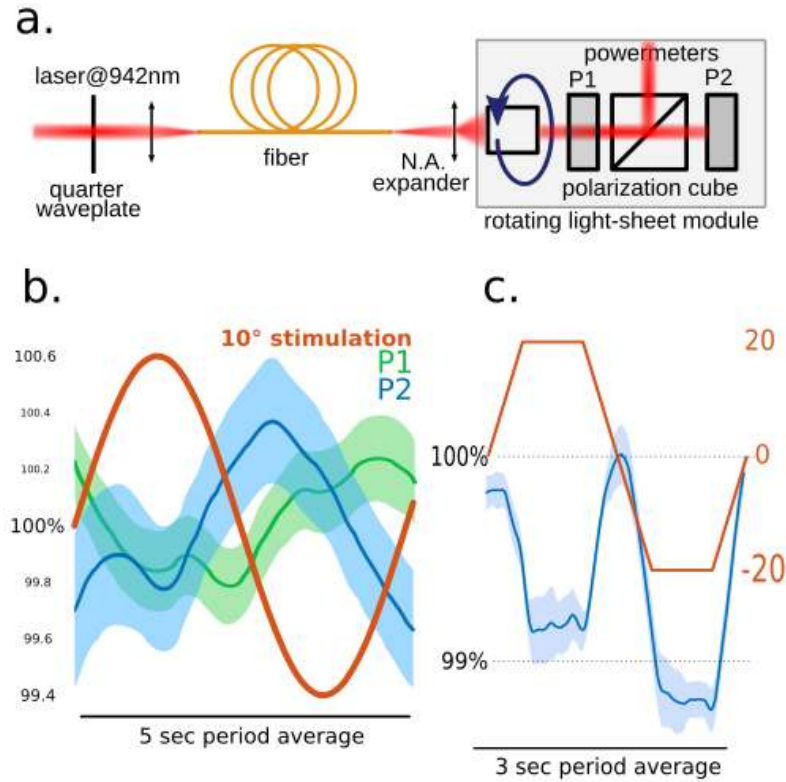


FIGURE IV.9 –

a. Setup de test en condition réelle

b. Réponse à une stimulation sinusoïdale périodique de 10° . On constate que les variations de puissance ne dépassent pas 0.6% et que ces variations combinées aux changements de la polarisation (ellipticité et rotation) n'excèdent pas 1.2%.

c. Réponse à une stimulation périodique en marches de 20° . Les variations combinées n'excèdent pas 1.2%. On remarque que l'intensité maximale est atteinte pour un angle du moteur de 0° , soit la position de repos de la fibre.

grandes variations d'ellipticité enregistrées sont de l'ordre de 5° . Pour vérifier comment ces différents éléments entrent en jeu, j'ai réalisé des tests en conditions réelles.

d) Test en conditions réelles

Pour tester les variations d'intensité dues aux déformations de la fibre en conditions réelles, j'ai monté un cube polariseur et un puissance-mètre à la place de l'échantillon et ai soumis l'ensemble à des stimulations périodiques guidées par un moteur (cf Fig. IV.9).

Finalement, tous les effets liés à la position de la fibre engendrent des variations de l'intensité détectée inférieurs à 1.2% dans les conditions des expériences. Les effets parasites sont donc connus et mineurs, ce qui est à prendre en compte lors de l'analyse des données.

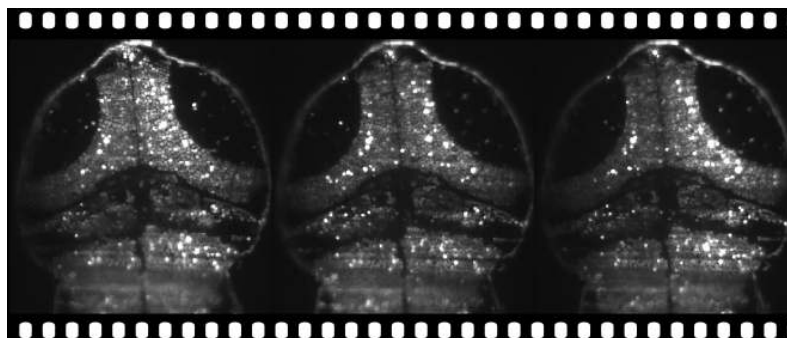


FIGURE IV.10 – Images extraites d’un film montrant les changements d’intensité liés à l’effet thermique. On y voit la distribution d’intensité lumineuse se déplacer de gauche à droite (direction de propagation du faisceau) au rythme des mouvements du moteur.

IV.4 Effet de lentille thermique

On a vu que la fibre avait de bonnes propriétés en conditions réelles, pourtant en essayant d’imager un poisson en deux photons tout en bougeant le microscope, on observe des fluctuations d’intensité de grande amplitude (Fig. IV.10). En regardant attentivement à l’oeil, on s’aperçoit que ces fluctuations sont liées à un déplacement de la zone la plus lumineuse le long de la direction de propagation du faisceau qui rend toute exploitation des données impossible. Cette observation a pu être expliquée par l’effet de lentille thermique (*thermal lens effect*) modulé par un déplacement des masses d’eau de températures différentes.

Lorsqu’un faisceau traverse un milieu absorbant, ce milieu chauffe sur la trajectoire du faisceau, ce qui change son indice optique. Le gradient d’indice ainsi formé dévie les rayons, formant une lentille à gradient d’indice (GRIN lens). Pour l’eau, à 915 nm, le changement d’indice est de l’ordre de -10^{-4} par degré. La température étant plus élevée au centre du faisceau, l’indice optique est plus faible, et donc la lentille équivalente est divergente. Cet effet peut être utile, par exemple pour mesurer le coefficient d’absorption d’un liquide [85], mais il a deux conséquences gênantes dans mon cas. D’une part un effet statique lié à la perte de focalisation du faisceau altère l’effet deux-photons, d’autre part un effet dynamique lié à la réponse du système à une perturbation de la température d’équilibre dévie le faisceau lors des mouvements du microscope.

IV.4.1 Effet statique

Le phénomène de lentille thermique a été décrit théoriquement en 1965 par Gordon *et al* [86] et en 1974 par Whinnery *et al* [85] pour une fine cellule de liquide et dans le cadre de l’approximation parabolique (partie a)). En 1982, Sheldon *et al* [87] étend cette description hors de l’approximation parabolique pour prendre en compte les aberrations induites. Dans notre cas, il ne s’agit pas d’une cellule fine, car le laser traverse plusieurs centimètres d’eau avant d’atteindre l’échantillon, créant un gradient d’indice sur sa trajectoire. Je me suis donc inspiré du livre *Gradient-Index Optics* [88], dans lequel les auteurs s’intéressent à la propagation d’un faisceau dans un milieu d’indice : (équation 1.63 du livre)

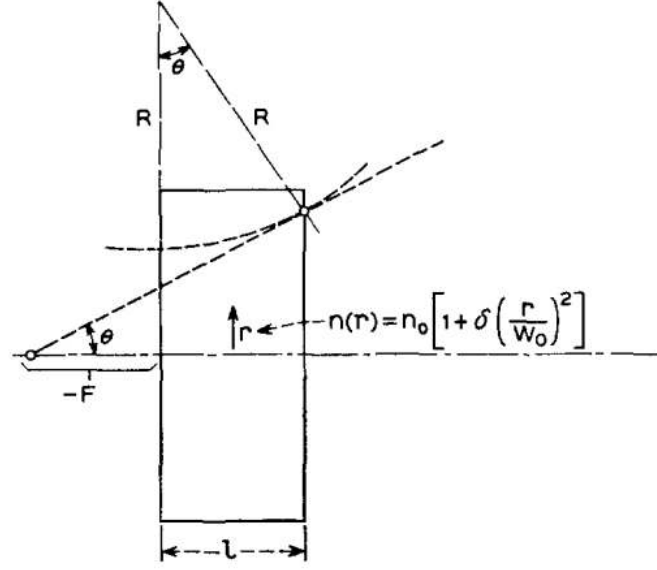


FIG. 4. Sketch for obtaining lens focal length.

FIGURE IV.11 – Lentille équivalente pour une cellule de largeur l d'indice parabolique dans laquelle un rayon lumineux se propage en arc de cercle. Extrait de Gordon *et al* [86].

$$n(r, z) = n_0(z) \left(1 \pm \frac{g^2(z)}{2} r^2 \right)$$

Dans le cas d'un signe négatif (lentille convergente), les calculs sont largement détaillés et aboutissent à une solution oscillante. Malheureusement le cas d'un signe positif (lentille divergente) n'est pas exploré. Pour obtenir un résultat en ordre de grandeur, nous avons donc opté pour une approche discrète numérique en appliquant à chaque tranche de liquide d'épaisseur l les résultats obtenus pour une cellule fine (partie b)). Cette approximation ignore la diffusion thermique le long de l'axe et considère l'absorption négligeable.

a) Cas d'une cellule fine

Dans cette partie, j'explique le résultat des papiers de Gordon et Whinnery que j'utilise par la suite dans la simulation numérique. Dans une cellule fine traversée par un faisceau, le différentiel de température par rapport à l'équilibre $\Delta T(r, t)$ est décrit par l'équation de diffusion :

$$c\rho \frac{\partial}{\partial t} [\Delta T(r, t)] = \dot{q}(r) + k \nabla^2 [\Delta T(r, t)]$$

Le terme source de l'équation lié à l'absorption du faisceau de puissance P par le milieu de coefficient d'absorption α vaut :

$$\dot{q}(r) = \frac{\alpha P}{\pi w_z^2} \exp \left(\frac{-2r^2}{w_z^2} \right)$$

Ce qui donne une solution de la forme :

$$\Delta T(r, t) = \frac{\alpha P}{4\pi k} \int_0^t \left(\frac{1}{1 + 2t'/t_c} \right) \exp \left(\frac{-2r^2/w_z^2}{1 + 2t'/t_c} \right) dt' \quad \text{où} \quad t_c = \frac{w_z^2}{4D}$$

Dans notre cas, on se contentera de l'approximation au premier ordre de cette solution :

$$\Delta T(r, t) \simeq \frac{\alpha P}{4\pi k} \left[\ln \left(1 + \frac{2t}{t_c} \right) - \frac{2(r^2/w_z^2)}{1 + t_c/2t} \right]$$

Le premier terme est indépendant de r et correspond au réchauffement progressif global de la tranche de liquide. De plus, il est de plus en plus lent à mesure que l'on s'éloigne du waist et se retrouve dominé par les conditions aux limites et par la diffusion le long de l'axe ici non exprimées. On peut donc l'ignorer pour simplifier le calcul sans altérer le résultat. On a donc :

$$\Delta T(r, t) = \Delta T_\infty \frac{1}{1 + t_c/2t} \quad \text{où} \quad \Delta T_\infty = \Delta T(r, t_\infty) = -\frac{\alpha P}{2\pi k} \frac{r^2}{w_z^2}$$

Si l'on suppose constant le coefficient de variation de l'indice optique (dn/dT), on a donc un profil d'indice quadratique en r :

$$n(r, z) = n_0 + \frac{dn}{dT} \Delta T = n_0 \left(1 + \delta(r/w_z)^2 \right) \quad \text{où} \quad \delta = -\frac{dn}{dT} \frac{\alpha P}{2\pi k n_0} \frac{2}{1 + t_c/2t}$$

Pour un profil d'indice quadratique tel que celui-ci et dans l'approximation des lentilles minces, on peut définir la distance focale équivalente :

$$f' = -\frac{w_z^2}{2ln_0\delta}$$

Cela permet d'établir la valeur de la focale F au cours du temps :

$$f'(t) = f'_\infty \left(1 + \frac{t_c}{2t} \right) \quad \text{où} \quad f'_\infty = \frac{\pi k w_z^2}{\alpha P l (dn/dT)}$$

On a donc une valeur de la focale f' d'une tranche de liquide d'épaisseur l . Dans un premier temps, intéressons-nous au régime stationnaire à t_∞ .

b) Simulation numérique

Pour décrire la propagation du faisceau à travers un milieu épais, on le divise en éléments fins. On part du principe que le faisceau reste gaussien tout au long du parcours, il peut donc être entièrement décrit pour chaque z par la position et la largeur de son waist. Pour chaque tranche de liquide d'épaisseur l , on applique l'effet de la lentille équivalente dont la focale est définie suivant la partie précédente pour trouver le déplacement du waist et son élargissement. Le code de cette simulation numérique est publié à l'adresse <https://github.com/Hugo-Trentesaux/these>. La figure IV.12 montre le résultat de cette simulation comparé à une mesure expérimentale.

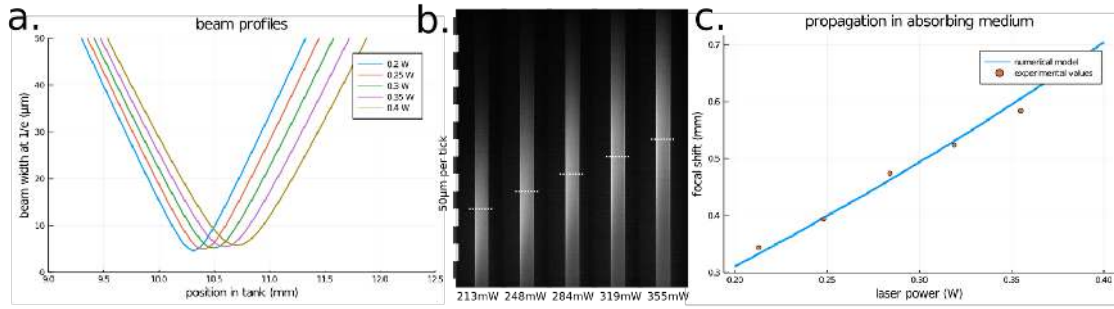


FIGURE IV.12 – Effet de lentille thermique pour la propagation dans l'eau.

a. Résultat de la simulation pour plusieurs puissances de laser. Comme attendu, plus la puissance est élevée, plus l'effet divergent est fort, et donc plus le waist est éloigné et large.

b. Feuille de lumière imagée dans la fluorescéine pour plusieurs puissances laser différentes. La position du maximum d'intensité est marquée par un trait en pointillé.

c. Comparaison des prévisions du modèle et des données expérimentales.

IV.4.2 Effet dynamique

L'effet de lentille thermique a une composante dynamique liée au temps d'établissement de l'équilibre de température. Cet effet a un temps caractéristique $t_c = \frac{w_z^2}{4D}$ qui dépend uniquement de la largeur du faisceau (on considère constante $D = 1.43 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ la diffusivité thermique de l'eau). Au début de la propagation dans la cuve, le faisceau est large (1 mm), ce qui donne un temps caractéristique de l'ordre de plusieurs secondes. Près du waist, au contraire, ce temps est très court, de l'ordre de la microseconde. Il faut donc réaliser une simulation pour estimer la dynamique du système complet. En pratique, on constate un temps d'établissement de l'ordre de la seconde.

Annexe A

Appendice

A.1 Langage de programmation adapté

A.1.1 Memory mapping

Du fait du volume des données traitées, notre processus d'analyse repose largement sur le `memory mapping` comme solution de gestion des données brutes. Cela permet de traiter une portion de mémoire disque comme une portion de mémoire vive et ainsi de n'appliquer les opérations de chargement de données en mémoire vive qu'au moment de leur utilisation et de ne pas écrire systématiquement les opérations de lecture et d'écriture. Je compare ici les interfaces fournies dans les langages de programmation Matlab, Python, et Julia ainsi que la manière dont elles peuvent être étendues par des classes ou structures.

a) Matlab

La langage Matlab fournit la fonction `memmapfile` ([doc](#)) qui permet de cartographier une zone mémoire contenant des données de type `int8`, `int16`, `int32`, `int64`, `uint8`, `uint16`, `uint32`, `uint64`, `single`, ou `double`. J'ai implémenté plusieurs surcouches de la classe Matlab `memmapfile` qui permettent de gérer l'accès à des données stockées sous différents formats comme le `dcimg`, d'autre orientations que celle par défaut, et en utilisant l'indexation linéaire suivant (xy) en une seule ligne. Ces classes ont facilité l'écriture de code pour la manipulation des données brutes et aux différentes étapes de traitement, ainsi que des interfaces graphiques rudimentaires utilisées pour les visualiser mais ne permettent pas de profiter des optimisations de Matlab sur la vectorisation du calcul. De plus, une gestion manuelle de la mémoire et des abstractions sur les tableaux de données manquent au langage pour que ces classes soit facilement réutilisables, ce qui conduit à de la duplication de code. Ci-dessous on peut voir la structure adoptée pour ces classes, qui surchargent les méthodes intégrées au langage `subsref` et `subsasgn`.

```
classdef Mmap < handle
% the class Mmap is used to load a mmap of a binary file
% and redefine layers index when called as subscript
% subscript can be 4D or 3D

% [...] properties, constructor, and other methods definition
```

```

function out = subsref(self, S)
    switch S(1).type
        case '()'
            new_S = self.subStruct(S);
            % [...] subscript manipulation
            out = subsref(self.mmap.Data.bit, new_S);
            % [...] returned data manipulation
            end
        case ' .'
            out = builtin('subsref', self, S);
        otherwise
            error('subsref other than () or . not implemented')
    end
end
end
end

```

b) Python

Le langage Python offre également une classe `mmap` ([doc](#)) ainsi que sa bibliothèque Numpy avec la classe `memmap` ([doc](#)). Une option `order` permet de préciser l'ordre des données en mémoire, et donc d'adapter simplement la manière dont les données sont stockées à la manière donc elles seront utilisées. CaImAn implémente également une surcouche fine sur cette classe pour gérer ses conventions d'organisation de fichiers, où de nombreuses informations sont contenues dans le nom de fichier. J'en montre ci-dessous un extrait.

```

def load_memmap(filename: str, mode: str = 'r') ->
    Tuple[Any, Tuple, int]:
    # [...]
    Yr = np.memmap(
        file_to_load,
        mode=mode,
        shape=prepare_shape((d1 * d2 * d3, T)),
        dtype=np.float32,
        order=order
    )
    if d3 == 1:
        return (Yr, (d1, d2), T)
    else:
        return (Yr, (d1, d2, d3), T)

```

c) Julia

Le langage Julia intègre un module dédié au `memory mapping` ([doc](#)) qui permet d'accéder aux données par un objet qui se comporte de manière identique à un tableau Julia. Via le concept d'interfaces ([doc](#)), en particulier l'interface de tableau, il est facile d'écrire une surcouche immédiatement compatible avec n'importe quelle fonction prenant en argument un tableau Julia. Cela est très différent de Matlab où il faut écrire des fonctions

spécifiques et légèrement différent de Python où l'écriture de classes intermédiaires génère un surcoût important par rapport à Numpy. Je montre ici un exemple de surcouche mince sur la structure Julia `mmap`. Il est extrêmement facile de surcharger une telle classe Julia pour l'adapter à des usages différents sans avoir à en modifier le comportement. Par exemple, il suffit d'une dizaine de lignes pour rendre une telle structure compatible avec les données stockées sous le format de CaImAn tout en conservant la compatibilité avec d'autres formats, et pour un coût nul à l'exécution.

```
using Mmap

# ===== structure definition =====
struct Stack{T,N} <: AbstractArray{T,N}
    file::String          # path plus filename of raw raster file
    dims::NTuple{N,Int}   # N integers correspondig to dimension sizes
    space::String          # e.g. RAST
    m::Array{T,N}         # memory mapped array
    # core constructor
    Stack(file::String, T::DataType, dims::NTuple, space::String) =
        new{T,length(dims)}(file, dims, space,
            Mmap.mmap(open(file), Array{T, length(dims)}, dims))
end

# [...] more methods like constructor overload

# ===== interface implementation =====
# following functions allows to access Stack like an Array
Base.size(S::Stack) = S.dims
# linear indexing
Base.getindex(S::Stack, i::Int) = S.m[i]
# cartesian indexing
Base.getindex(S::Stack{T,N}, I::Vararg{Int, N}) where {T,N} = S.m[I...]
```


Bibliographie

- [1] J. GOENSE, Y. BOHRAUS & N. K. LOGOTHETIS ; «fMRI at High Spatial Resolution : Implications for BOLD-Models» ; **10**. ISSN 1662-5188. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncom.2016.00066/full> ; publisher : Frontiers. 1
- [2] L. BERDONDINI, K. IMFELD, A. MACCIONE, M. TEDESCO, S. NEUKOM, M. KOUDELKA-HEP & S. MARTINOIA ; «Active pixel sensor array for high spatio-temporal resolution electrophysiological recordings from single cell to large scale neuronal networks» ; **9**, p. 2644–2651. ISSN 1473-0189. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2009/lc/b907394a> ; publisher : The Royal Society of Chemistry. 1
- [3] B. E. STEIN & T. R. STANFORD ; «Multisensory integration : current issues from the perspective of the single neuron» ; **9**, p. 255–266. ISSN 1471-003X, 1471-0048. <http://www.nature.com/articles/nrn2331>. 1, 4, 5
- [4] B. BONATH, T. NOESSELT, A. MARTINEZ, J. MISHRA, K. SCHWIECKER, H.-J. HEINZE & S. A. HILLYARD ; «Neural Basis of the Ventriloquist Illusion» ; **17**, p. 1697–1703. ISSN 0960-9822. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982207019069>. 4
- [5] M. S. BEAUCHAMP, B. D. ARGALL, J. BODURKA, J. H. DUYN & A. MARTIN ; «Unraveling multisensory integration : patchy organization within human STS multisensory cortex» ; **7**, p. 1190–1192. ISSN 1546-1726. <https://www.nature.com/articles/nrn1333> ; number : 11 Publisher : Nature Publishing Group. 4
- [6] M. S. BEAUCHAMP ; «Statistical Criteria in fMRI Studies of Multisensory Integration» ; **3**, p. 93–113. ISSN 1539-2791. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2843559/>. 4
- [7] M. BROSCHE, E. SELEZNEVA & H. SCHEICH ; «Nonauditory Events of a Behavioral Procedure Activate Auditory Cortex of Highly Trained Monkeys» ; **25**, p. 6797–6806. ISSN 0270-6474, 1529-2401. <https://www.jneurosci.org/content/25/29/6797> ; publisher : Society for Neuroscience Section : Behavioral/Systems/Cognitive. 4
- [8] E. BUDINGER, P. HEIL, A. HESS & H. SCHEICH ; «Multisensory processing via early cortical stages : Connections of the primary auditory cortical field with other sensory systems» ; **143**, p. 1065–1083. ISSN 0306-4522. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452206011158>. 4
- [9] J. K. BIZLEY, F. R. NODAL, V. M. BAJO, I. NELKEN & A. J. KING ; «Physiological and Anatomical Evidence for Multisensory Interactions in Auditory Cortex» ; **17**, p.

- 2172–2189. ISSN 1047-3211. <https://academic.oup.com/cercor/article/17/9/2172/273122>; publisher : Oxford Academic. 5
- [10] B. L. ALLMAN & M. A. MEREDITH; «Multisensory Processing in “Unimodal” Neurons : Cross-Modal Subthreshold Auditory Effects in Cat Extrastriate Visual Cortex»; **98**, p. 545–549. ISSN 0022-3077. <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/jn.00173.2007>; publisher : American Physiological Society. 5
- [11] D. E. ANGELAKI & K. E. CULLEN; «Vestibular System : The Many Facets of a Multimodal Sense»; **31**, p. 125–150. ISSN 0147-006X, 1545-4126. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125555>. 5
- [12] J. DRIVER & T. NOESELDT; «Multisensory Interplay Reveals Crossmodal Influences on ‘Sensory-Specific’ Brain Regions, Neural Responses, and Judgments»; **57**, p. 11–23. ISSN 0896-6273. [https://www.cell.com/neuron/abstract/S0896-6273\(07\)01019-7](https://www.cell.com/neuron/abstract/S0896-6273(07)01019-7); publisher : Elsevier. 5
- [13] 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»; **7**. ISSN 1662-5110. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2013.00065/abstract>. 6
- [14] A. VERKHRATSKY & H. KETTENMANN; «Calcium signalling in glial cells»; **19**, p. 346–352. ISSN 0166-2236. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166223696100485>. 6
- [15] F. W. PFRIEGER & B. A. BARRES; «Synaptic Efficacy Enhanced by Glial Cells in Vitro»; **277**, p. 1684–1687. ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://science.sciencemag.org/content/277/5332/1684.1>; publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Report. 6
- [16] C. GRIENBERGER & A. KONNERTH; «Imaging Calcium in Neurons»; **73**, p. 862–885. ISSN 0896-6273. [https://www.cell.com/neuron/abstract/S0896-6273\(12\)00172-9](https://www.cell.com/neuron/abstract/S0896-6273(12)00172-9); publisher : Elsevier. 7
- [17] P. A. SANTI; «Light Sheet Fluorescence Microscopy : A Review»; . <https://journals.sagepub.com/doi/10.1369/0022155410394857>; publisher : SAGE PublicationsSage CA : Los Angeles, CA. 11
- [18] R. M. POWER & J. HUISKEN; «A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging»; **14**, p. 360–373. ISSN 1548-7091, 1548-7105. <http://www.nature.com/articles/nmeth.4224>. 11
- [19] 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»; **14**, p. 1107–1114. ISSN 1548-7091, 1548-7105. <http://www.nature.com/articles/nmeth.4429>. 12
- [20] J. MERTZ; «Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination»; **8**, p. 811–819. ISSN 1548-7105. <https://www.nature.com/articles/nmeth.1709>; number : 10 Publisher : Nature Publishing Group. 12
- [21] 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»; . ISSN 0028-0836, 1476-4687. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11057>. 12, 43

- [22] J. H. BOLLMANN ; «The Zebrafish Visual System : From Circuits to Behavior» ; **5**, p. 269–293. ISSN 2374-4642, 2374-4650. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-vision-091718-014723>. 12, 13
- [23] C. HADDON & J. LEWIS ; «Early ear development in the embryo of the Zebrafish, *Danio rerio*» ; **365**, p. 113–128. ISSN 1096-9861. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291096-9861%2819960129%29365%3A1%3C113%3A%3AAID-CNE9%3E3.0.CO%3B2-6>. 12
- [24] R. PORTUGUES & F. ENGERT ; «The neural basis of visual behaviors in the larval zebrafish» ; **19**, p. 644–647. ISSN 0959-4388. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4524571/>. 13
- [25] B. B. RILEY & S. J. MOORMAN ; «Development of utricular otoliths, but not saccular otoliths, is necessary for vestibular function and survival in zebrafish» ; **43**, p. 329–337. ISSN 1097-4695. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-4695%2820000615%2943%3A4%3C329%3A%3AAID-NEU2%3E3.0.CO%3B2-H>. 13
- [26] I. A. FAVRE-BULLE, G. VANWALLEGHEM, M. A. TAYLOR, H. RUBINSZTEIN-DUNLOP & E. K. SCOTT ; «Cellular-Resolution Imaging of Vestibular Processing across the Larval Zebrafish Brain» ; **28**, p. 3711–3722.e3. ISSN 09609822. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982218312855>. 14, 15
- [27] 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» ; **22**, p. 1285–1295. ISSN 0960-9822. [https://www.cell.com/current-biology/abstract/S0960-9822\(12\)00579-9](https://www.cell.com/current-biology/abstract/S0960-9822(12)00579-9) ; publisher : Elsevier. 14, 15
- [28] D. E. EHRLICH & D. SCHOPPIK ; «Control of Movement Initiation Underlies the Development of Balance» ; **27**, p. 334–344. ISSN 09609822. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096098221631449X>. 15, 18, 19, 23
- [29] D. E. EHRLICH & D. SCHOPPIK ; «A primal role for the vestibular sense in the development of coordinated locomotion» ; **8**, p. e45839. ISSN 2050-084X. <https://doi.org/10.7554/eLife.45839> ; publisher : eLife Sciences Publications, Ltd. 18
- [30] T. WALTEMATE, I. SENNA, F. HÜLSMANN, M. ROHDE, S. KOPP, M. ERNST & M. BOTSCH ; «The impact of latency on perceptual judgments and motor performance in closed-loop interaction in virtual reality» ; dans «Proceedings of the 22nd ACM Conference on Virtual Reality Software and Technology», VRST '16 ; p. 27–35 (Association for Computing Machinery) ; ISBN 978-1-4503-4491-3. <https://doi.org/10.1145/2993369.2993381>. 20
- [31] K. SEVERI, R. PORTUGUES, J. MARQUES, D. O'MALLEY, M. ORGER & F. ENGERT ; «Neural Control and Modulation of Swimming Speed in the Larval Zebrafish» ; **83**, p. 692–707. ISSN 0896-6273. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627314005789>. 22
- [32] I. A. FAVRE-BULLE, A. B. STILGOE, H. RUBINSZTEIN-DUNLOP & E. K. SCOTT ; «Optical trapping of otoliths drives vestibular behaviours in larval zebrafish» ; **8**, p. 630. ISSN 2041-1723. <http://www.nature.com/articles/s41467-017-00713-2>. 29

- [33] G. MIGAULT, T. L. v. d. 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»; . 29, 30, 47
- [34] M. PACHITARIU, C. STRINGER, S. SCHRÖDER, M. DIPOPPA, L. F. ROSSI, M. CARANDINI & K. D. HARRIS; «Suite2p : beyond 10,000 neurons with standard two-photon microscopy»; p. 061507. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/061507v1>; publisher : Cold Spring Harbor Laboratory Section : New Results. 35
- [35] A. GIOVANNUCCI, J. FRIEDRICH, P. GUNN, J. KALFON, B. L. BROWN, S. A. KOAY, J. TAXIDIS, F. NAJAFI, J. L. GAUTHIER, P. ZHOU, B. S. KHAKH, D. W. TANK, D. B. CHKLOVSKII & E. A. PNEVMATIKAKIS; «CaImAn an open source tool for scalable calcium imaging data analysis»; 8, p. e38173. ISSN 2050-084X. <https://doi.org/10.7554/eLife.38173>; publisher : eLife Sciences Publications, Ltd. 35
- [36] D. A. DOMBECK, A. N. KHABBAZ, F. COLLMAN, T. L. ADELMAN & D. W. TANK; «Imaging Large-Scale Neural Activity with Cellular Resolution in Awake, Mobile Mice»; 56, p. 43–57. ISSN 0896-6273. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627307006149>. 40
- [37] T. V. TRUONG, W. SUPATTO, D. S. KOOS, J. M. CHOI & S. E. FRASER; «Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy»; 8, p. 757–760. ISSN 1548-7105. <https://www.nature.com/articles/nmeth.1652>; number : 9 Publisher : Nature Publishing Group. 43
- [38] 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»; 11, p. 883–884. ISSN 1548-7091, 1548-7105. <http://www.nature.com/articles/nmeth.3040>. 43
- [39] S. WOLF, W. SUPATTO, G. DEBRÉGEAS, P. MAHOU, S. G. KRUGLIK, J.-M. SINTES, E. BEAUREPAIRE & R. CANDELIER; «Whole-brain functional imaging with two-photon light-sheet microscopy»; 12, p. 379–380. ISSN 1548-7105. <https://www.nature.com/articles/nmeth.3371>; number : 5 Publisher : Nature Publishing Group. 43
- [40] V. MAIOLI, A. BONIFACE, P. MAHOU, J. F. ORTAS, L. ABDELADIM, E. BEAUREPAIRE & W. SUPATTO; «Fast in vivo multiphoton light-sheet microscopy with optimal pulse frequency»; 11, p. 6012–6026. ISSN 2156-7085. <https://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?uri=boe-11-10-6012>; publisher : Optical Society of America. 44
- [41] Y. Y. WANG, N. V. WHEELER, F. COUNY, P. J. ROBERTS & F. BENABID; «Low loss broadband transmission in hypocycloid-core Kagome hollow-core photonic crystal fiber»; 36, p. 669. ISSN 0146-9592, 1539-4794. <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ol-36-5-669>. 46, 48
- [42] R. F. CREGAN, B. J. MANGAN, J. C. KNIGHT, T. A. BIRKS, P. S. J. RUSSELL, P. J. ROBERTS & D. C. ALLAN; «Single-Mode Photonic Band Gap Guidance of Light in Air»; 285, p. 1537–1539. ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://science.sciencemag.org/content/285/5433/1537>; publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Report. 46, 48

- [43] L. VINCETTI & V. SETTI; «Waveguiding mechanism in tube lattice fibers»; **18**, p. 23133–23146. ISSN 1094-4087. <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-18-22-23133>; publisher : Optical Society of America. 46, 48
- [44] F. YU & J. C. KNIGHT; «Negative Curvature Hollow-Core Optical Fiber»; **22**, p. 146–155. ISSN 1077-260X, 1558-4542. <https://ieeexplore.ieee.org/document/7225120/>. 46, 48, 55
- [45] A. D. PRYAMIKOV, A. S. BIRIUKOV, A. F. KOSOLAPOV, V. G. PLOTNICHENKO, S. L. SEMJONOV & E. M. DIANOV; «Demonstration of a waveguide regime for a silica hollow - core microstructured optical fiber with a negative curvature of the core boundary in the spectral region > 3.5 um»; **19**, p. 1441–1448. ISSN 1094-4087. <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-19-2-1441>; publisher : Optical Society of America. 46
- [46] S. MILLER & A. BECK; «Low-Loss Waveguide Transmission»; **41**, p. 348–358. ISSN 0096-8390. <http://ieeexplore.ieee.org/document/4051317/>. 46
- [47] H. G. UNGER; «Circular Electric Wave Transmission in a Dielectric-Coated Waveguide»; **36**, p. 1253–1278. ISSN 00058580. <https://ieeexplore.ieee.org/document/6768999>. 46
- [48] K. S. PACKARD; «The Origin of Waveguides : A Case of Multiple Rediscovery»; **32**, p. 961–969. ISSN 1557-9670; conference Name : IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. 46
- [49] R. D. MAURER; «Glass fibers for optical communications»; **61**, p. 452–462. ISSN 1558-2256; conference Name : Proceedings of the IEEE. 46
- [50] A. ANKIEWICZ & G. PENG; «Generalized Gaussian approximation for single-mode fibers»; **10**, p. 22–27. ISSN 1558-2213; conference Name : Journal of Lightwave Technology. 46
- [51] D. GLOGE; «Dispersion in Weakly Guiding Fibers»; **10**, p. 2442–2445. ISSN 2155-3165. <https://www.osapublishing.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-10-11-2442>; publisher : Optical Society of America. 47
- [52] K. JÜRGENSEN; «Gaussian pulse transmission through monomode fibers, accounting for source linewidth»; **17**, p. 2412–2415. ISSN 2155-3165. <https://www.osapublishing.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-17-15-2412>; publisher : Optical Society of America. 47
- [53] R. L. FORK, O. E. MARTINEZ & J. P. GORDON; «Negative dispersion using pairs of prisms»; **9**, p. 150–152. ISSN 1539-4794. <https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-9-5-150>; publisher : Optical Society of America. 47
- [54] G. P. AGRAWAL; «Nonlinear Fiber Optics»; dans P. L. CHRISTIANSEN, M. P. SØRENSEN & A. C. SCOTT (rédacteurs), «Nonlinear Science at the Dawn of the 21st Century», Lecture Notes in Physics; p. 195–211 (Springer); ISBN 978-3-540-46629-1. 47
- [55] F. HELMCHEN, W. DENK & J. N. D. KERR; «Miniaturization of Two-Photon Microscopy for Imaging in Freely Moving Animals»; **2013**, p. pdb.top078147. ISSN 1940-3402, 1559-6095. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2013/10/pdb.top078147>; publisher : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 47

- [56] S. W. CLARK, F. O. ILDAY & F. W. WISE; «Fiber delivery of femtosecond pulses from a Ti :sapphire laser»; **26**, p. 1320–1322. ISSN 1539-4794. <https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-26-17-1320>; publisher : Optical Society of America. 47
- [57] C. LEFORT, M. KALASHYAN, G. DUCOURTHIAL, T. MANSURYAN, R. P. O’CONNOR & F. LOURADOUR; «Sub-30-fs pulse compression and pulse shaping at the output of a 2-m-long optical fiber in the near-infrared range»; **31**, p. 2317–2324. ISSN 1520-8540. <https://www.osapublishing.org/josab/abstract.cfm?uri=josab-31-10-2317>; publisher : Optical Society of America. 47
- [58] E. A. J. MARCATILI & R. A. SCHMELTZER; «Hollow metallic and dielectric waveguides for long distance optical transmission and lasers»; **43**, p. 1783–1809. ISSN 0005-8580; conference Name : The Bell System Technical Journal. 47
- [59] A. ARGYROS, M. A. VAN EIJKELNBORG, M. C. LARGE & I. M. BASSETT; «Hollow-core microstructured polymer optical fiber»; **31**, p. 172. ISSN 0146-9592, 1539-4794. <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ol-31-2-172>. 48
- [60] F. BENABID; «Stimulated Raman Scattering in Hydrogen-Filled Hollow-Core Photonic Crystal Fiber»; **298**, p. 399–402. ISSN 00368075, 10959203. <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1076408>. 48
- [61] S. FÉVRIER, B. BEAUDOU & P. VIALE; «Understanding origin of loss in large pitch hollow-core photonic crystal fibers and their design simplification»; **18**, p. 5142–5150. ISSN 1094-4087. <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-18-5-5142>; publisher : Optical Society of America. 48
- [62] D. A. DOMBECK, C. D. HARVEY, L. TIAN, L. L. LOOGER & D. W. TANK; «Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation»; **13**, p. 1433–1440. ISSN 1097-6256. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2967725/>. 49, 50
- [63] F. HELMCHEN, M. S. FEE, D. W. TANK & W. DENK; «A Miniature Head-Mounted Two-Photon Microscope : High-Resolution Brain Imaging in Freely Moving Animals»; **31**, p. 903–912. ISSN 0896-6273. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627301004214>. 49, 50
- [64] J. SAWINSKI, D. J. WALLACE, D. S. GREENBERG, S. GROSSMANN, W. DENK & J. N. D. KERR; «Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals»; **106**, p. 19 557–19 562. ISSN 0027-8424. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2773198/>. 49, 50
- [65] C. J. ENGELBRECHT, R. S. JOHNSTON, E. J. SEIBEL & F. HELMCHEN; «Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging in vivo»; **16**, p. 5556–5564. ISSN 1094-4087. <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-16-8-5556>; publisher : Optical Society of America. 49, 50, 51
- [66] S. TURTAEV, I. T. LEITE, T. ALTWEGG-BOUSSAC, J. M. P. PAKAN, N. L. ROCHEFORT & T. ČIŽMÁR; «High-fidelity multimode fibre-based endoscopy for deep brain in vivo imaging»; **7**, p. 92. ISSN 2047-7538. <http://www.nature.com/articles/s41377-018-0094-x>. 49, 50

- [67] B. SCOTT, C. BRODY & D. TANK ; «Cellular Resolution Functional Imaging in Behaving Rats Using Voluntary Head Restraint» ; **80**, p. 371–384. ISSN 0896-6273. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627313007125>. 48
- [68] D. ARONOV & D. TANK ; «Engagement of Neural Circuits Underlying 2D Spatial Navigation in a Rodent Virtual Reality System» ; **84**, p. 442–456. ISSN 0896-6273. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627314007430>. 50
- [69] J. R. WHITLOCK ; «Navigating actions through the rodent parietal cortex» ; **8**. ISSN 1662-5161. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnhum.2014.00293/full> ; publisher : Frontiers. 50
- [70] W. ZONG, R. WU, M. LI, Y. HU, Y. LI, J. LI, H. RONG, H. WU, Y. XU, Y. LU, H. JIA, M. FAN, Z. ZHOU, Y. ZHANG, A. WANG, L. CHEN & H. CHENG ; «Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice» ; **14**, p. 713–719. ISSN 1548-7105. <https://www.nature.com/articles/nmeth.4305> ; number : 7 Publisher : Nature Publishing Group. 50
- [71] S.-P. TAI, M.-C. CHAN, T.-H. TSAI, S.-H. GUOL, L.-J. CHEN & C.-K. SUN ; «Two-photon fluorescence microscope with a hollow-core photonic crystal fiber» ; **12**, p. 6122–6128. ISSN 1094-4087. <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-12-25-6122> ; publisher : Optical Society of America. 50, 51
- [72] H. CHOI & P. T. C. SO ; «Improving femtosecond laser pulse delivery through a hollow core photonic crystal fiber for temporally focused two-photon endomicroscopy» ; **4**, p. 6626. ISSN 2045-2322. <https://www.nature.com/articles/srep06626> ; number : 1 Publisher : Nature Publishing Group. 50, 51
- [73] W. PIYAWATTANAMETHA, E. D. COCKER, L. D. BURNS, R. P. J. BARRETTO, J. C. JUNG, H. RA, O. SOLGAARD & M. J. SCHNITZER ; «In vivo brain imaging using a portable 2.9 g two-photon microscope based on a microelectromechanical systems scanning mirror» ; **34**, p. 2309–2311 ISSN 0146-9592. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2826365/>. 50, 51
- [74] A. KLIOUTCHNIKOV, D. J. WALLACE, M. H. FROSZ, R. ZELTNER, J. SAWINSKI, V. PAWLAK, K.-M. VOIT, P. S. J. RUSSELL & J. N. D. KERR ; «Three-photon head-mounted microscope for imaging deep cortical layers in freely moving rats» ; **17**, p. 509–513. ISSN 1548-7105. <https://www.nature.com/articles/s41592-020-0817-9> ; number : 5 Publisher : Nature Publishing Group. 50, 51
- [75] B. B. SCOTT, S. Y. THIBERGE, C. GUO, D. G. R. TERVO, C. D. BRODY, A. Y. KARPOVA & D. W. TANK ; «Imaging Cortical Dynamics in GCaMP Transgenic Rats with a Head-Mounted Widefield Macrocope» ; **100**, p. 1045–1058.e5. ISSN 0896-6273. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627318308523>. 50
- [76] B. A. FLUSBERG, J. C. JUNG, E. D. COCKER, E. P. ANDERSON & M. J. SCHNITZER ; «In vivo brain imaging using a portable 3.9 g two-photon fluorescence microendoscope» ; **30**, p. 2272–2274. ISSN 1539-4794. <https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-30-17-2272> ; publisher : Optical Society of America. 50, 51
- [77] I. N. PAPADOPOULOS, S. FARAH, C. MOSER & D. PSALTIS ; «High-resolution, lensless endoscope based on digital scanning through a multimode optical fiber» ; **4**, p. 260–270. ISSN 2156-7085. <https://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?uri=boe-4-2-260> ; publisher : Optical Society of America. 50

- [78] S. OHAYON, A. CARAVACA-AGUIRRE, R. PIESTUN & J. J. DiCARLO ; «Minimally invasive multimode optical fiber microendoscope for deep brain fluorescence imaging» ; **9**, p. 1492–1509. ISSN 2156-7085. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5905901/>. 50
- [79] E. R. ANDRESEN, G. BOUWMANS, S. MONNERET & H. RIGNEAULT ; «Two-photon lensless endoscope» ; **21**, p. 20 713–20 721. ISSN 1094-4087. <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-21-18-20713> ; publisher : Optical Society of America. 51
- [80] A. KUDLINSKI, A. CASSEZ, O. VANVINCQ, D. SEPTIER, A. PASTRE, R. HABERT, K. BAUELLE, M. DOUAY, V. MYTSKANIUK, V. TSVIRKUN, H. RIGNEAULT & G. BOUWMANS ; «Double clad tubular anti-resonant hollow core fiber for nonlinear microendoscopy» ; **28**, p. 15 062. ISSN 1094-4087. <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=oe-28-10-15062>. 51
- [81] A. LOMBARDINI, V. MYTSKANIUK, S. SIVANKUTTY, E. R. ANDRESEN, X. CHEN, J. WENGER, M. FABERT, N. JOLY, F. LOURADOUR, A. KUDLINSKI & H. RIGNEAULT ; «High-resolution multimodal flexible coherent Raman endoscope» ; **7**, p. 10. ISSN 2047-7538. <https://www.nature.com/articles/s41377-018-0003-3> ; number : 1 Publisher : Nature Publishing Group. 51
- [82] V. SETTI, L. VINCETTI & A. ARGYROS ; «Flexible tube lattice fibers for terahertz applications» ; **21**, p. 3388–3399. ISSN 1094-4087. <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-21-3-3388> ; publisher : Optical Society of America. 55
- [83] M. H. FROSZ, P. ROTH, M. C. GÜNENDI & P. S. J. RUSSELL ; «Analytical formulation for the bend loss in single-ring hollow-core photonic crystal fibers» ; **5**, p. 88–91. ISSN 2327-9125. <https://www.osapublishing.org/prj/abstract.cfm?uri=prj-5-2-88> ; publisher : Optical Society of America. 55
- [84] G. DE VITO, P. RICCI, L. TURRINI, V. GAVRYUSEV, C. MÜLLENBROICH, N. TISO, F. VANZI, L. SILVESTRI & F. S. PAVONE ; «Effects of excitation light polarization on fluorescence emission in two-photon light-sheet microscopy» ; **11**, p. 4651. ISSN 2156-7085, 2156-7085. <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=boe-11-8-4651>. 55
- [85] J. R. WHINNERY ; «Laser measurement of optical absorption in liquids» ; **7**, p. 225–231. ISSN 0001-4842, 1520-4898. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar50079a003>. 59
- [86] J. P. GORDON, R. C. C. LEITE, R. S. MOORE, S. P. S. PORTO & J. R. WHINNERY ; «Long-Transient Effects in Lasers with Inserted Liquid Samples» ; **36**, p. 3–8. ISSN 0021-8979, 1089-7550. <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1713919>. 59, 60
- [87] S. J. SHELDON, L. V. KNIGHT & J. M. THORNE ; «Laser-induced thermal lens effect : a new theoretical model» ; **21**, p. 1663. ISSN 0003-6935, 1539-4522. <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ao-21-9-1663>. 59
- [88] C. GOMEZ-REINO, M. V. PEREZ & C. BAO ; *Gradient-Index Optics* (Springer Berlin Heidelberg) ; ISBN 978-3-642-07568-1 978-3-662-04741-5. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-04741-5>. 59