
RAPPORT DE PSC :

Caractérisation neuronale de la surdité chez les souris

GROUPE BIO01 :

Aliou BA

Laure BARATGIN

Stella CHOI

Inès FERNANDEZ

Victoria HARDY

Charlotte RICHARD

Mathieu RITA

Sous la direction du tuteur **Brice Bathellier**

Sous la direction des coordinateurs **Yves Mechulam** et

Pierre-Damien Coureux



Table des matières

Introduction	5
1 Accéder au codage cortical de l'information sonore	7
1.1 Le codage neuronal de l'information sonore	7
1.2 Elaboration du protocole de l'expérience	9
1.2.1 Préparation des souris	9
1.2.2 Choix et synthèse des profils sonores	9
1.2.3 Elaboration d'un caisson isolant	10
1.3 Fonctionnement des instruments de mesure et principes de base relatifs aux expériences	13
1.3.1 Microscopie 2-photons	13
1.3.2 Sélection des neurones par algorithme de "cliquage"	13
1.3.3 Données brutes recueillies et correction des biais	15
2 Premiers résultats et interprétations	17
2.1 Préliminaire statistique : Peut-on considérer que les signaux obtenus correspondent à des réponses physiologiques ? Dispose-t-on d'un critère permettant de sélectionner parmi les signaux ceux qui correspondent à des réponses physiologiques ?	17
2.1.1 Peut-on considérer que le signal correspond à un phénomène physiologique ?	18
2.1.2 Persistance et localisation d'une réponse dans le temps : détermination d'un critère permettant de sélectionner les réponses physiologiques sur un signal	19
2.2 Analyse générale de la réponse de l'échantillon	21
2.2.1 Etude quantitative simple : y a-t-il une corrélation entre le nombre de cellules activées et la complexité d'un son ?	23
2.3 Organisation spatiale de l'aire corticale observée	25
2.3.1 Étude spatiale du codage de l'intensité	25
2.3.2 Cartographie neuronale en fonction de la fréquence	25

3 Analyse fonctionnelle des neurones	29
3.1 Analyse fonctionnelle de la réactivité d'un neurone	29
3.1.1 Neurones réagissant à presque tous les sons	30
3.1.2 Neurones dont l'activité est spécifique à l'écoute de quelques sons	31
3.2 Clusters de neurones	32
3.2.1 Contours du problème	33
3.2.2 Regroupement ascendant hiérarchique	33
3.2.3 Résultats après nettoyage de notre jeu de données	35
3.2.4 Détermination des clusters de fonctionnalité sur l'ensemble des cellules réactives	37
3.2.5 Organisation spatiale des clusters identifiés	39
4 Perspectives et regard critique sur les résultats	41
4.1 Analyse et critique des résultats	41
4.2 Perspectives, solutions envisagées	42
5 Bibliographie	48

Remerciements

Parvenus au terme de ce projet, nous prenons conscience du chemin parcouru et de l'accompagnement qui nous a été apporté tout au long de l'année écoulée. Nous tenons premièrement naturellement à remercier nos coordinateurs, **Yves Mechulam** et **Pierre-Damien Coureux** qui nous ont encadrés en nous conseillant d'approfondir certains points suite aux premières formes que prenait le projet.

Mais ce projet dépasse le cadre de l'Ecole. En effet, il est né d'une visite à l'**Unité de neurosciences, information et complexité (UNIC)**, laboratoire spécialisé dans le codage cortical de l'information sonore et soutenu par le CNRS. Là-bas, nous avons rencontré notre tuteur, **Brice Bathellier**, directeur de l'équipe « Dynamiques corticales et intégration multisensorielle », qui nous a grandement aidé à choisir un sujet viable parmi les idées qui nous venaient à l'esprit au fil des discussions et des lectures de ses travaux.

Nous avons également grandement collaboré avec **Alexandre Kempf**, qui effectue une thèse au sein de l'équipe. Il nous a permis de réaliser les expériences nécessaires à l'avancement du projet et nous a guidés tout au long de notre projet. Nous le remercions grandement pour tout le temps qu'il nous a consacré à préparer les souris, à nous expliquer le traitement des données et à répondre à toutes nos questions.

Nous tenons plus à remercier l'Unité pour l'accueil qui nous a été fait et les moyens matériels qui ont été mis à notre disposition.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à ce projet, et nous espérons que le travail vous satisfera !

Introduction

La surdité est une altération de la perception des sons, et notamment de leur intensité : un son d'une intensité donnée sera perçu avec une intensité sonore plus faible par une personne sourde.

Dans la plupart des cas, la surdité s'explique soit par une atteinte de l'oreille externe ou moyenne (surdité de transmission due à un obstacle perturbant la transmission des ondes acoustiques), soit par une lésion au niveau de la cochlée ou des nerfs auditifs (surdité de perception due à une mauvaise propagation des messages nerveux). Dans ces cas de surdité-là, plusieurs remèdes sont possibles. Tout d'abord, des traitements chirurgicaux permettent de réparer les lésions de l'oreille externe et moyenne et de retirer les tumeurs du nerf auditif. D'autre part, il existe des prothèses et des implants. Ensuite, les prothèses auditives peuvent s'avérer très efficaces, notamment dans le cas d'une surdité de transmission, elles améliorent la transmission du son en l'amplifiant ou en se servant de la conduction osseuse. Enfin, l'implant cochléaire est la solution utilisée en cas de surdité sévère, il s'agit d'une « cochlée artificielle » qui permet la simulation directe des neurones cochléaires, le son est directement transmis sous forme d'impulsions électriques aux cellules nerveuses.

Cependant, des études récentes¹ ont montré que la surdité trouve parfois son origine au niveau du cortex auditif. Dès lors, il convient d'envisager de nouveaux systèmes de réhabilitation auditive car les remèdes courants ne sont plus efficaces en cas d'altération du cortex auditif. Afin de pouvoir concevoir une alternative efficace, il faut tout d'abord comprendre comment se caractérise la surdité au niveau neuronal. Cela nécessite d'étudier le codage de l'information auditive par le cortex. Des études récentes, menées notamment par l'équipe de Brice Bathellier, se sont attachés à caractériser l'activité des neurones du cortex auditif, en fonction de paramètres divers tels que la fréquence, l'intensité et le profil temporel des sons.

1. L'unité de recherche de ‘Génétique et physiologie de l’audition’, menée par des chercheurs de l’Institut Pasteur, de l’Inserm et de l’UPMC

Jusqu'alors, leurs études se sont uniquement intéressées à des sons d'intensité supérieure au bruit de leur microscope. Pour travailler sur le problème de la surdité, nous avons voulu explorer des gammes d'intensité plus faibles afin de répondre aux questions suivantes :

Peut-on établir une classification des neurones du cortex auditif en fonction des caractéristiques des sons auxquels ils réagissent ? Peut-on mettre en évidence une corrélation entre une telle classification et l'organisation spatiale du cortex auditif ? Comment exploiter cette caractérisation pour comprendre et éventuellement proposer des solutions aux défauts d'audition ?

Réunis par l'intérêt commun que nous portons aux neurosciences, le sujet de notre projet scientifique s'est construit lors de nos premiers entretiens avec notre tuteur Brice Bathellier, chercheur au sein de l'Unité de neuroscience, information et complexité (UNIC). Notre motivation principale était d'appliquer la recherche fondamentale sur le codage neuronal des sons au service de la santé en cherchant des pistes pour traiter le problème de la surdité d'origine cérébrale.

Chapitre 1

Accéder au codage cortical de l'information sonore

1.1 Le codage neuronal de l'information sonore

Le système auditif se constitue du système auditif périphérique, responsable du codage de l'information sonore en potentiels électriques qui part du pavillon pour s'étendre jusqu'aux premiers neurones du nerf auditif et du système auditif central, qui va des premiers neurones jusqu'au cerveau et qui est responsable de l'interprétation de l'information sonore. Le son est recueilli par l'oreille externe puis est transmis à l'oreille moyenne qui assure une transmission mécanique. L'oreille interne est constitué de la cochlée, enroulée autour du nerf auditif. Les parois du canal cochléaire sont composées de cellules ciliées au contact desquelles prennent naissance les fibres du nerf auditif. La cochlée va transformer les sons en signaux électriques transmis au cerveau. Les fibres du nerf auditif répondent sélectivement aux sons dont la fréquence est proche de leur fréquence caractéristique, directement liée aux points d'innervation des fibres [2]. Ce codage est de type spatial ou tonotopique. Le système nerveux est bilatéral c'est-à-dire composé de fibres afférentes et efférentes. L'influx nerveux quittant la périphérie passe par différents relais qui vont chacun effectuer un travail spécifique de décodage et d'interprétation pour ensuite le transmettre aux relais supérieurs. On compte 4 relais pour les voies auditives primaires : les noyaux cochléaires, le complexe olivaire supérieur, le colliculus et le thalamus. Les noyaux cochléaires réalisent une analyse et un codage des propriétés physiques du son. Les noyaux olivaires jouent ensuite un rôle dans la localisation du son. C'est là qu'ont lieu les premières afférences binaurales, certains neurones étant sensibles à des différences interaurales de temps ou d'intensité. Les centres de passage immédiatement supérieurs sont moins bien connus : le lemnisque latéral, le colliculus inférieur jouant un rôle pour la perception du son et le corps genouillé médian (thalamus) jouant un rôle pour la compréhension de la parole. Enfin, les aires auditives corticales réalisent un traitement complexe réparti sur les aires avec une large interconnexion. Il n'y a à priori pas de spécificité exclusive des aires, et leurs rôle et fonctionnement peuvent largement évoluer par plasticité. Fina-

lement, la réponse des neurones est complexe et varie fortement en fonction des caractéristiques du son. Il y a donc une grande diversité du type de neurones auditifs corticaux reflétant peut-être différentes étapes dans le traitement sonore. Le cortex auditif primaire et les aires adjacentes ne réalisent sans doute pas les mêmes étapes de traitement. En effet, plus un son est complexe spatialement ou temporellement, plus les activations s'étendent dans les aires adjacentes. Le rôle du cortex auditif primaire est encore débattu. Il serait plus impliqué dans des traitements auditifs de base comme le traitement de la fréquence ou de l'intensité, alors que les aires adjacentes interviendraient plus dans l'analyse de sons complexes, comme la musique[3].

Comme on peut le remarquer avec l'utilisation du conditionnel, de nombreuses questions demeurent sans réponse sur le codage du son par le cortex auditif, notamment sur la surdité d'origine corticale. Notre but dans ce PSC était donc de répondre à certaines de ces questions.

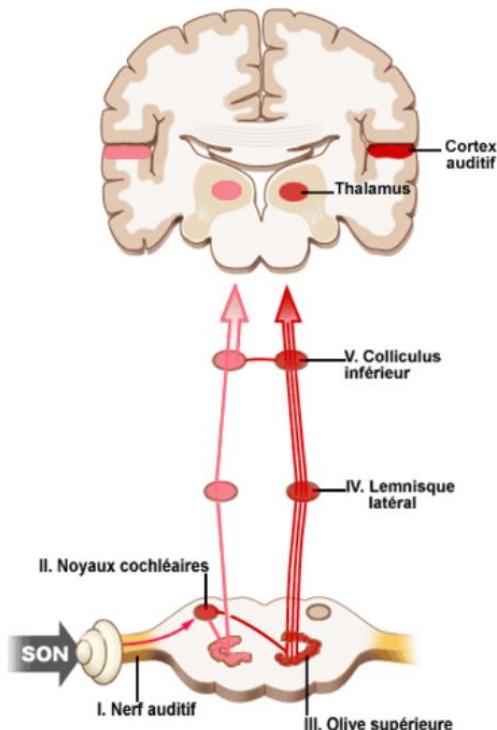


Fig. 1.1 – Mesures prises au laboratoire

1.2 Elaboration du protocole de l'expérience

Pour caractériser le codage neuronal dans le cortex auditif des souris, nous avons sélectionné différents profils sonores pour nous permettre de visualiser l'influence de la fréquence et celle de l'intensité du son dans la perception auditive. Y a-t-il une corrélation directe entre intensité de l'activité neuronale et intensité du son ? Existe-t-il des clusters (groupes) de neurones répondant spécifiquement à certaines gammes de fréquence ?

1.2.1 Préparation des souris

Il s'agit ici d'avoir accès à l'intensité de la réponse neuronale. Il y a deux principales méthodes connues pour observer l'activité neuronale. L'une permet d'observer en précision un neurone, l'autre donne accès à l'observation d'une zone beaucoup plus étendue (des centaines de neurones dans notre cas) mais est moins précise. Étudier le codage d'une information par le cortex revient à étudier la localisation des cellules activées et l'intensité des réponses de ces dernières. Une vue d'ensemble est donc nécessaire et seule la deuxième méthode est exploitable.

Cette méthode est basée sur la transformation d'une réponse neuronale en signal lumineux via une protéine, la GCaMP6s. Le signal lumineux est ensuite enregistré par un microscope 2-photons.

Il s'agit donc de construire un indicateur fluorescent en greffant un domaine protéique sur une protéine fluorescente, la GCaMP6s [1]. En interagissant avec des ions calcium, le domaine protéique imprime un changement de conformation à la structure de la protéine fluorescente, ce qui a pour effet de faire varier sa fluorescence. La GCaMP6s est constituée d'une GFP, intercalée entre une protéine liant le calcium appelée calmoduline (CaM) et un peptide synthétique appelé M13. En l'absence de calcium, la GFP est faiblement fluorescente. En liant le calcium, le domaine CaM s'enroule autour du peptide M13 et provoque un changement conformationnel de la protéine qui restaure la fluorescence de la GFP.

Au moins 3 semaines avant l'imagerie, une craniotomie de 5 mm de diamètre est effectuée au-dessus du cortex auditif. 3 injections de GCaMP6s de 150 nL sont administrées. La fenêtre crânienne est fermée par une vitre à laquelle on ajoute une attache en métal qui permettra par la suite de maintenir la tête de la souris immobile. Deux jours avant l'expérience, les souris sont habituées à rester immobiles une quinzaine de minutes dans la position qui permettra l'observation.

1.2.2 Choix et synthèse des profils sonores

Les récents travaux de l'UNIC [4] se sont attachés à comprendre la réponse du cortex auditif pour des sons de différentes fréquences et intensités, laissant entrevoir une spécialisation fonctionnelle des neurones. L'objectif de nos expériences est d'observer les réponses du cortex auditif et en particulier à faible intensité.

Quels sont les neurones dont l'activité va être modifiée lorsque l'intensité décroît ? La surdité est-elle caractérisée par une perte d'activité neuronale globale ou locale ? Quels sont les profils sonores dont la perception est la plus altérée par une baisse de l'intensité sonore ? Pour y répondre, nous avons choisi d'utiliser des sons harmoniques à différentes intensités (de 30 à 80 dB par pas de 5 dB). Nous nous sommes placés aux fréquences 4kHz, 8kHz et 16 kHz afin de balayer l'ensemble de la plage fréquentielle dans laquelle est optimisée la perception auditive des souris (les souris perçoivent correctement les sons sur une plage de fréquence allant entre 2 à 32 kHz environ). Enfin, les expériences préalablement menées sur des souris montrent que le seuil de douleur pour les souris est proche de 80 dB : nous avons donc décidé de ne pas dépasser ce seuil d'intensité pour les expériences.

Les sons synthétisés avec Python durent 500ms et seront joués dans un ordre aléatoire, espacés par des silences. Chaque son sera joué 20 fois. Cela permet ainsi de s'assurer que la perception de chaque son n'est pas modifiée par le son précédent, et de moyenner la réponse corticale sur chacune de ces répétitions.

1.2.3 Elaboration d'un caisson isolant

Nous avons choisi des sons d'intensité faible (30 dB) car l'étude des défauts d'audition nécessite d'analyser les réponses des souris à de faibles intensités. Or, le bruit du microscope, estimé à environ 50 dB, empêchait d'explorer des intensités plus faibles. Il nous fallait régler ce problème de seuil d'intensité avant de commencer les expériences. On a donc pensé à concevoir un caisson isolant afin d'explorer des sons d'intensité encore plus faible. Avant de commencer, plusieurs points pratiques devaient être respectés. Tout d'abord, le dispositif expérimental présentait des contraintes d'encombrements dues à l'objectif de la caméra et le haut-parleur. D'autre part, il fallait que le caisson soit démontable pour pouvoir l'installer à chaque début d'expérience, puis le désinstaller. Enfin, il fallait recouvrir l'intérieur de la boîte avec de la mousse isolante, pour le rendre isolant.

Au cours des deux premiers mois, plusieurs étapes ont mené à la construction de cette boîte. Etant donné que l'Ecole polytechnique dispose d'un fablab, nous avons pensé que cette voie pouvait être une bonne option pour la réalisation du caisson. Nous avons donc pris des mesures précises des contraintes du dispositif au laboratoire.

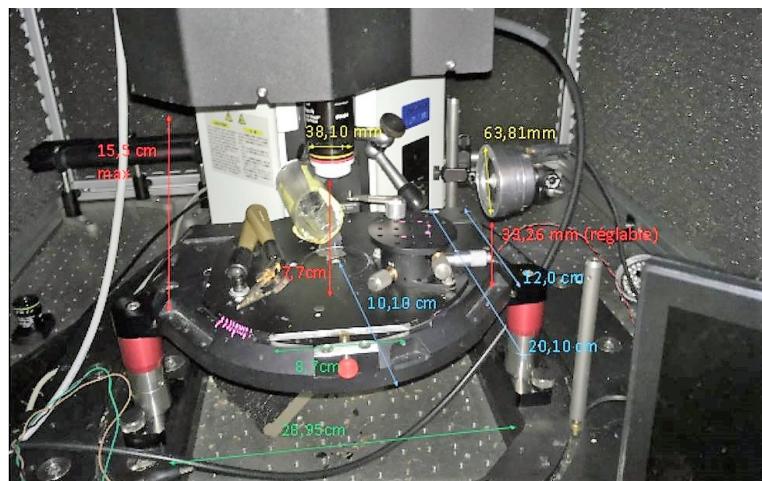


Fig. 1.2 – Mesures prises au laboratoire

Nous avions dessiné un modèle du caisson avec les premières mesures en essayant de respecter toutes les contraintes spatiales. D'abord, il ne pouvait pas être disposé sur la plateforme en un seul bloc. Il fallait qu'il soit constitué d'au moins deux blocs assemblables. De plus, le caisson devait présenter trois trous dans lesquels pourraient se glisser l'objectif, le haut-parleur et le micro. Seule l'imprimante 3D permettait de réaliser un modèle aussi complexe, bien qu'il nous a été difficile d'avoir des mesures précises des longueurs de la boîte. Néanmoins, pour réaliser ce caisson, il était beaucoup plus rapide d'utiliser l'imprimante 2D. Nous avons donc simplifié le modèle de la boîte pour obtenir un parallélépipède incluant trois trous. Afin de rendre cette boîte démontable avec l'imprimante 2D, nous avons utilisé un logiciel permettant, à partir des mesures, de réaliser le patron des 6 faces. Elles peuvent ensuite être assemblées et désassemblées grâce à des dents à la manière d'un puzzle.



Fig. 1.3 – Adhesive bonding using gauge

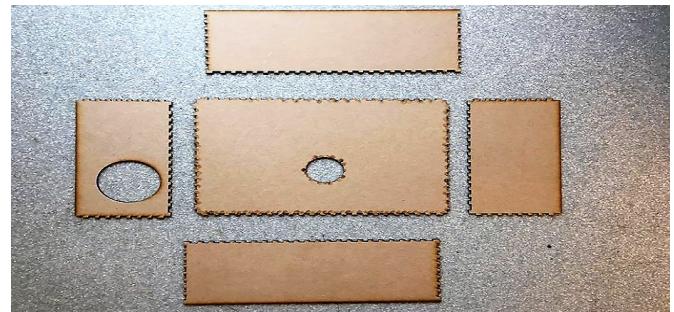


Fig. 1.4 – Adhesive bonding using gauge

Nous avons vérifié que la boîte atténuaient bien le bruit parasite du microscope en comparant l'intensité sonore avec et sans la boîte, en utilisant un oscilloscope. Les résultats furent satisfaisants : en effet, on a vu que les fréquences principales du bruit parasite étaient notablement atténueres en intensité. Le pic à 8 kHz fut diminué de 11,6 dB comme on peut l'observer en comparant les deux écrans de l'oscilloscope.

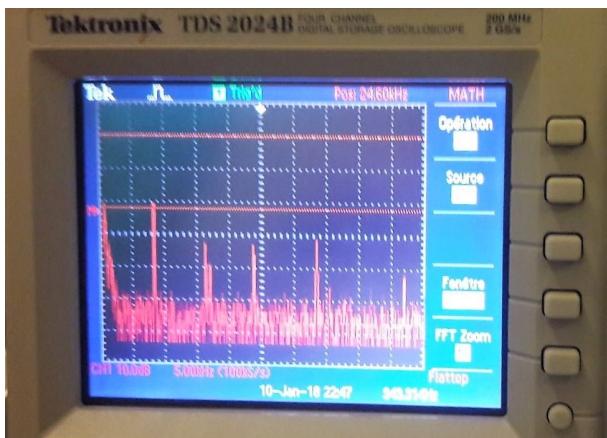


Fig. 1.5 – Bruit à l'intérieur du microscope mesuré

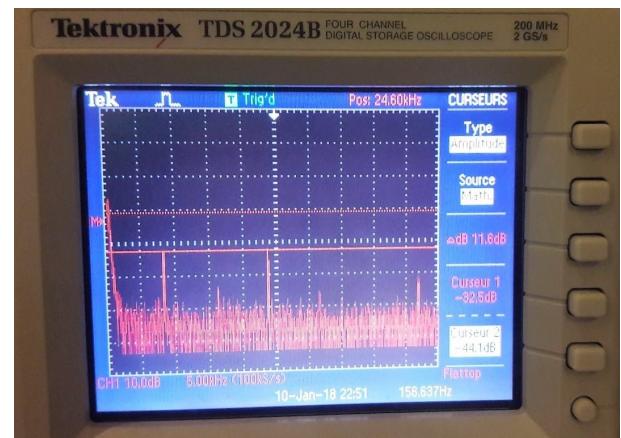
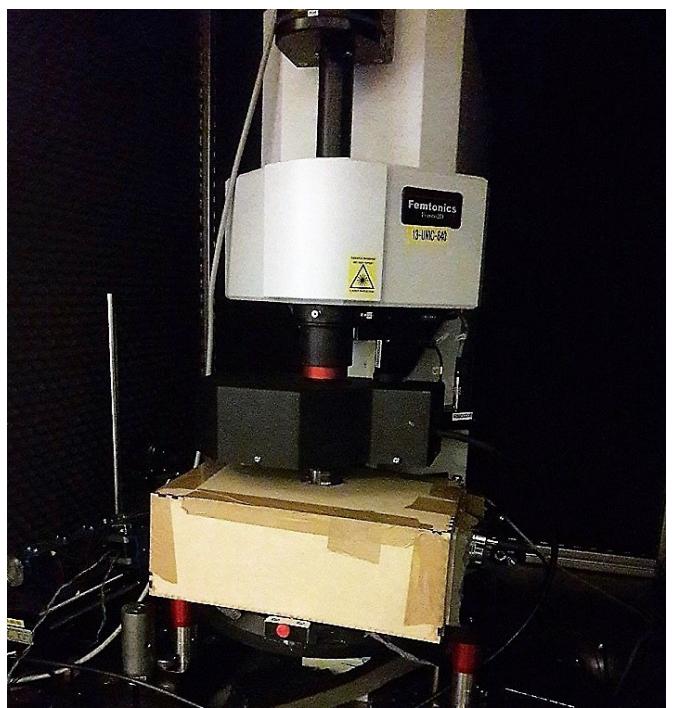


Fig. 1.6 – Bruit mesuré à l'intérieur du caisson installé

Nous avons pu la finir complètement avant les vacances de décembre pour pouvoir débuter les expériences au laboratoire dès janvier. Le retard nous a poussé à reculer la date des premières expériences mais la boîte reste un objectif réalisé et a marqué un saut dans l'avancement de notre projet.



1.3 Fonctionnement des instruments de mesure et principes de base relatifs aux expériences

1.3.1 Microscopie 2-photons

La microscopie par excitation à deux photons permet d'étudier à haute résolution non seulement la structure de la cellule, mais aussi son fonctionnement moléculaire au cours du temps[5].

Son principe de fonctionnement est le suivant : un rayonnement infrarouge est envoyé au moyen d'un laser à impulsions vers la fenêtre cérébrale de la souris à observer. Les neurones absorbent ce rayonnement et émettent un photon dans le domaine du visible par fluorescence, c'est cette émission de fluorescence qui nous permet de localiser les cellules actives. L'avantage de cette méthode d'observation est sa très grande résolution spatiale [6]. En effet, la génération de la fluorescence ne se produisant qu'au point focal, elle permet d'étudier l'activité du seul plan focal en supprimant tout effet parasite des autres plans. Cette propriété du microscope biphotonique permet une détection de la totalité de la fluorescence et donc de l'activité des neurones avec très peu de bruit de fond.

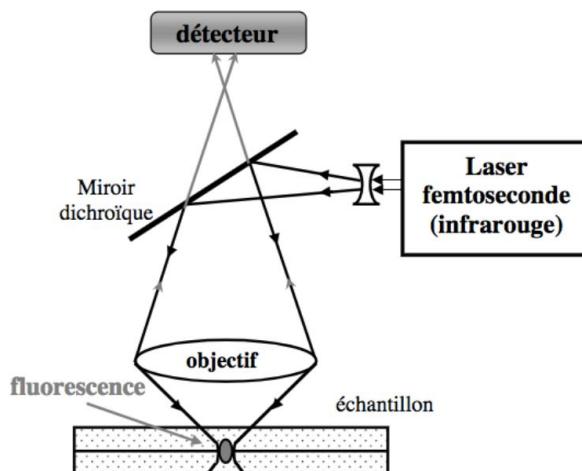


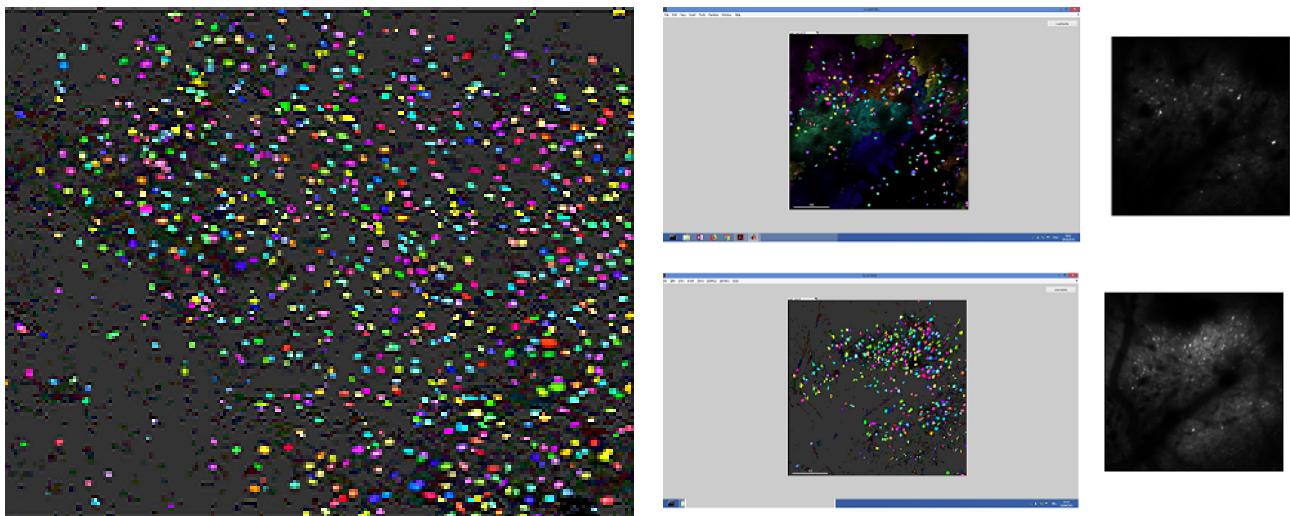
Fig. 1.7 – Principe du microscope de fluorescence par excitation biphotonique

1.3.2 Sélection des neurones par algorithme de "cliquage"

La première étape consiste à sélectionner les neurones dont on veut étudier l'activité au cours du temps. Pour cela, le laboratoire possède un algorithme de “cliquage” qui présélectionne les régions dont l'activité, mise en évidence par la fluorescence, ressemble à celle de neurones. Cette présélection prend en compte des paramètres d'entrée concernant la taille des cellules à conserver, qu'il faut donc ajuster lors de chaque expérience. L'algorithme utilisé fonctionne en deux temps. Dans un premier temps, il réalise un clustering sur l'activité des différents pixels et de leurs

voisins respectifs. Cela permet de réunir les pixels proches qui ont une activité similaire et sont donc susceptibles d'appartenir à la même cellule. L'image est alors organisée en régions qui ont une activité similaire. Dans un second temps, l'algorithme s'appuie sur des critères prédéfinis comme le nombre de pixels ou la forme des régions pour sélectionner ce qui lui semble être des régions d'intérêts. Nous devons ensuite affiner cette présélection manuellement en enlevant les zones sélectionnées qui ne correspondent pas à des neurones et en ajoutant les cellules omises par l'algorithme. Pour effectuer ce tri sélectif, nous avons à notre disposition deux enregistrements de l'expérience. Le premier présente l'image enregistrée à un instant donné qu'il est possible de faire défiler chronologiquement pour voir dans quelles cellules la fluorescence varie, il s'agit alors des cellules actives. Le deuxième enregistrement est la même image du cerveau sur laquelle est cette fois-ci représentée la dérivée de l'activité de fluorescence par rapport au temps. Les zones les plus intenses correspondent aux cellules dont la fluorescence varie fortement au cours du temps et donc aux cellules actives. Enfin, nous nous basons aussi sur des critères de forme et taille pour discriminer les cellules intéressantes. Cette étape, dite de "cliquage" est très importante car la pertinence des résultats dépend de la qualité de la sélection des neurones.

Sur les captures d'écran ci-dessous, les zones colorées correspondent aux cellules sélectionnées comme neurones et les 3 fenêtres correspondent aux 3 représentations nécessaires pour différencier les cellules actives des autres.



1.3.3 Données brutes recueillies et correction des biais

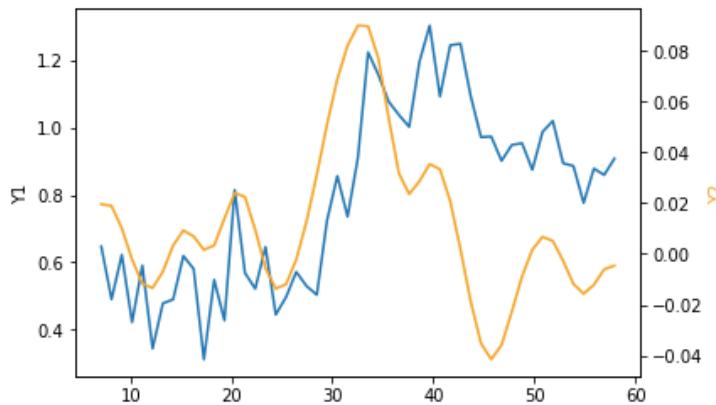


Fig. 1.8 – Signal d'origine en bleu, signal traité en jaune

Les données recueillies sont des images représentant la région considérée (une partie du cortex auditif). Chaque pixel permet de remonter à une activité lumineuse. Il s'agit de regrouper les pixels correspondant au même neurone pour n'avoir plus qu'une valeur d'intensité lumineuse par neurone. Les données sont ensuite concaténées en un tableau d'ordre 5, qui permet de lier l'expérience, la cellule concernée, le son joué, la répétition du son, ainsi que le temps. Ces données brutes ne sont cependant pas encore exploitables. Plusieurs opérations sont en effet nécessaires avant de pouvoir les exploiter. Nous avons suivi la démarche couramment utilisée dans ce type d'expériences [4] [7].

Premièrement, il s'agit de lisser la courbe afin de réduire le niveau de bruit. Un lissage gaussien est l'équivalent d'un filtre passe-bas. Le bruit varie avec une fréquence importante puisqu'il n'est pas corrélé au temps ; ce qui n'est pas le cas du signal qui sera préservé par le lissage.

Deuxièmement, une fois le signal débarrassé du bruit, il s'agit d'isoler la lumière uniquement émise par le neurone concerné. Or celle-ci est influencée par la fluorescence de la neuropile (axones et dendrites proches) qui l'entoure. Pour se défaire de cette fluorescence parasite, on soustrait 70% de la fluorescence moyenne de la neuropile à celle du neurone concerné.

Désormais, le signal reflète uniquement l'activité du neurone. Cependant, pour pouvoir comparer l'activité des neurones via leur fluorescence, il faut s'assurer qu'à une même activité correspond un même niveau de fluorescence. Or, ce n'est pas le cas pour plusieurs raisons : les cellules ne possèdent pas la même quantité initiale de GCaMP6s et la GCaMP6s peut elle-même être altérée à cause de la lumière (phénomène de « photobleaching »). Certaines cellules réagissent donc plus fortement en luminosité suite à une même stimulation. Afin de pouvoir néanmoins comparer les signaux, il s'agit de corriger le signal en lui soustrayant le niveau de fluorescence de base (« baseline »), et en normalisant le tout par celle-ci.

On a ainsi des signaux comparables, constitués de pics lumineux qui se succèdent au cours du temps. Cependant, l'émission de lumière par la protéine GCaMP6s se fait avec un décalage de 10 à 30 ms par rapport à l'activité neuronale (correspondant à la date d'entrée du calcium dans le neurone). Cela est dû au temps que met le calcium pour se lier à GCaMP6s et provoquer le changement de conformation à l'origine de la fluorescence. Cependant, au-delà de ce décalage, la protéine continue d'être fluorescente pendant 2 secondes, en dehors de toute activité neuronale, à cause du temps que met le calcium à se détacher. On obtient donc un signal lumineux de 2 secondes, décalé dans le temps par rapport à l'activation du neurone, alors que l'on souhaiterait pouvoir associer une seule valeur d'intensité lumineuse correspondant à la date d'activation du neurone. Pour obtenir la valeur souhaitée, on effectue la déconvolution du signal avec un filtre qui est le signal type d'un évènement de fluorescence.

Chapitre 2

Premiers résultats et interprétations

Nos données ainsi traitées, on peut caractériser les réponses neuronales de la souris à l'écoute d'un son. Notre approche est principalement fonctionnelle : nous souhaitons déterminer quelle est la fonction d'un neurone ou d'un groupe de neurone dans le codage cortical. En accord avec les connaissances que l'on a sur le son, nous allons étudier les différentes réactivités à des intensités et fréquences différentes.

Les résultats sont obtenus à partir de l'étude de trois expériences. Une grande partie des figures présentées appartiennent à une seule expérience pour simplifier le suivi de la démarche par le lecteur.

2.1 Préliminaire statistique : Peut-on considérer que les signaux obtenus correspondent à des réponses physiologiques ? Dispose-t-on d'un critère permettant de sélectionner parmi les signaux ceux qui correspondent à des réponses physiologiques ?

Dans notre expérience, nous avons répété l'écoute d'un son sur 20 essais (à des instants aléatoires, ce qui nous permet de considérer que la souris n'anticipe pas l'écoute du son). Nous allons étudier la corrélation entre ces essais pour déterminer s'il est viable de considérer les pics que nous observons comme des réponses. Nous voyons par exemple sur la Fig. 2.1 plusieurs pics qui ne correspondent peut-être pas à une réponse physiologique.

Nous souhaitons répondre aux questions : y a-t-il une corrélation entre les signaux correspondant aux différentes répétitions d'un même son ? Peut-on déterminer à quel instant a lieu la réponse ?

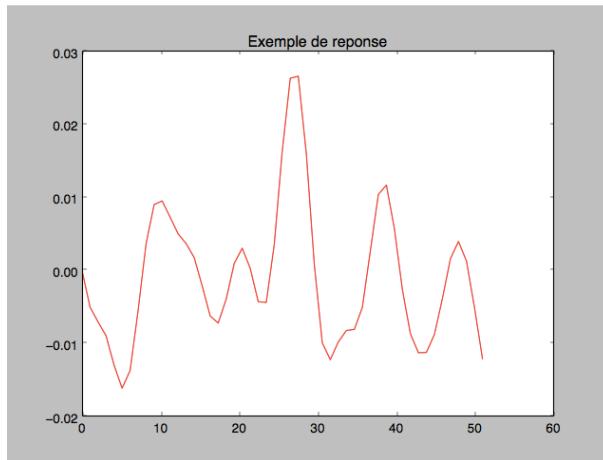


Fig. 2.1 – Exemple de réponse d'une cellule neuronale à l'écoute d'un son (son 50dB)

2.1.1 Peut-on considérer que le signal correspond à un phénomène physiologique ?

Pour cela nous définissons un critère de similarité qui prend à la fois en compte la reproductibilité des répétitions et la persistance d'une réponse dans le temps [4].

L'étape de traitement initiale de nos données nous permet de connaître l'état de fluorescence de chacune des cellules neuronales à un instant donné et pour une certaine répétition d'un son donné. Nous nous plaçons à son fixé et notons $c_j(t,i)$ l'état de fluorescence de la cellule j à l'instant t pour la répétition i . Ainsi, à chaque instant de temps, notre échantillon est représenté par un vecteur de taille (*nombre de cellules* \times 1) caractérisant son état de fluorescence :

$$s(t,i) = (c_1(t,i), c_2(t,i), \dots, c_{\text{nombre de cellules}}(t,i))$$

A un instant de temps fixé, nous pouvons étudier la similarité entre les différentes répétitions par la réalisation d'une matrice de corrélation. Celle-ci est produite à partir du coefficient de corrélation de Pearson. Celui-ci nous a semblé être la plus raisonnable pour comparer des réponses neuronales (voir **annexe A**).

Nous présentons en **Fig. 2.2** la matrice de corrélation entre les différents essais à un instant de temps t où il semble y avoir une réponse sur les signaux observés.

On constate que les coefficients de corrélation entre deux essais sont relativement bas ($<0,8$). Cependant, cela n'est pas une surprise au regard de la littérature [4][7]. En effet, les réponses d'un neurone sont très variables d'une répétition à l'autre. On peut même considérer que des coefficients comme ceux-ci sont très corrects. En effet, nous étudions ici l'état de fluorescence d'un échantillon de 240 cellules. Observer des coefficient de corrélation > 0.5 est donc satisfaisant. La littérature mentionne des coefficients de corrélation proches de 0.2 pour ce type de démarches. Cette similarité entre les essais nous engage à penser qu'au temps t considéré ici, on observe bien

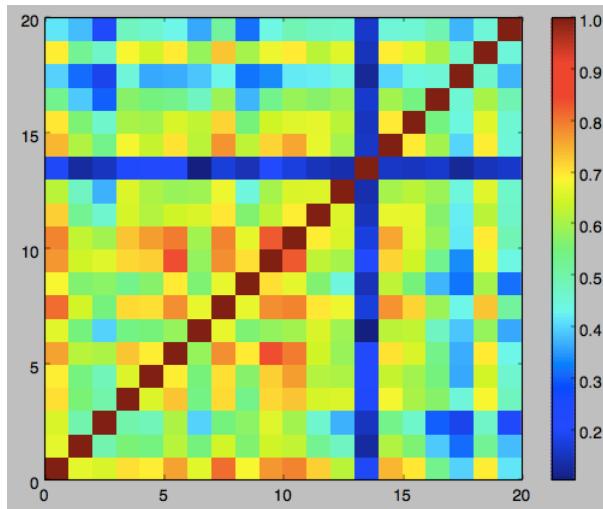


Fig. 2.2 – Matrice de similarité à l'instant t considéré comparant l'ensemble des 20 répétitions. L'indice $M_{i,j}(t) = \rho(s(t,i), s(t,j))$ correspond au coefficient de Pearson entre le vecteur d'état de la répétition i et le vecteur d'état de la répétition j .

une réponse physiologique, qui n'est pas le fruit du hasard (bruit). En effet, on s'attendrait dans le cas contraire à observer des coefficients de corrélation très faibles.

Cette reproductibilité satisfaisante de l'état de fluorescence des cellules pour différentes répétitions d'un même son nous laisse entrevoir la possibilité d'établir une moyenne sur ces différentes répétitions et donc de disposer d'un comportement moyen dans le temps des neurones à l'écoute d'un son.

En considérant le coefficient de corrélation moyen $\langle M_{i,j} \rangle_{i,j}$ pour un son à un instant t donné comme une bonne valeur de coefficient de corrélation, nous allons à présent essayer de voir si on peut évaluer la persistance d'une réponse dans le temps en calculant les coefficients de corrélation : $\rho(s(t,i), s(t,j))$ prenant en compte des états de fluorescence à instants distincts.

2.1.2 Persistance et localisation d'une réponse dans le temps : détermination d'un critère permettant de sélectionner les réponses physiologiques sur un signal

On peut réaliser une matrice de similarité comme celle présentée en Fig. 2.2 mais pour deux instants t et t' différents. Cela nous permet de mesurer la corrélation entre les vecteurs d'états des différents essais à des instants différents. Au moment d'une réponse, pour deux temps proches, on s'attend à obtenir une bonne corrélation entre les deux vecteurs d'état : $s(t)$ et $s(t')$. Nous allons donc réaliser une matrice de persistance dans le temps qui tient compte de ce constat.

Nous adoptons la méthodologie suivante :

- On calcule de la matrice de similarité entre les temps t et t' dont les coefficients sont $M_{i,j}(t) = \rho(s(t,i), s(t,j))$
- On résume la similarité en une valeur : $m(t,t') = \langle M_{i,j}(t,t') \rangle_{i,j}$
- On définit une matrice de persistance dans le temps de taille (*nombre de sons* \times *nombre de sons*) dont les coefficients sont : $m(t,t')_{t,t'}$ où t et t' définissent les points de temps.

Nous représentons les résultats obtenus en Fig 2.3. La figure du dessus représente la matrice de similarité calculée pour un son. On constate deux zones de forte corrélation entre les points de temps 12 et 21 et entre les points de temps 24 et 32.

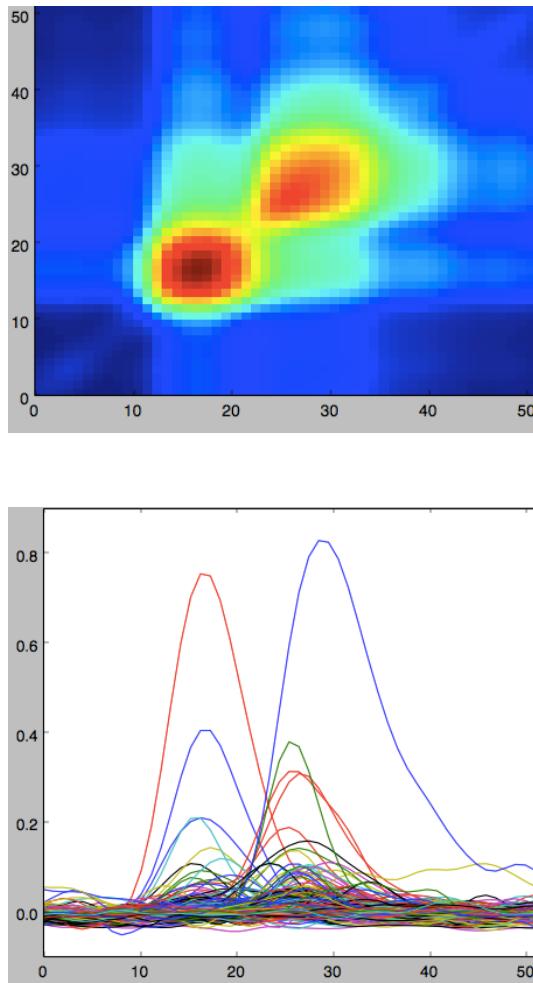


Fig. 2.3 – Matrice de persistance dans le temps (au-dessus) et tracés de l'évolution moyenne de la fluorescence de chacune des cellules dans le temps (en-dessous)

D'après l'analyse faite au-dessus, cela correspond en théorie aux deux réponses physiologiques des cellules neuronales à l'écoute du son. On peut vérifier cette idée en superposant notre matrice à la figure du dessous. Celle-ci représente l'évolution moyenne de la fluorescence des différentes neurones de notre échantillon. On constate que les cellules réagissent principalement sur deux intervalles de temps qui correspondent bien à ceux trouvés par la matrice de persistance. De plus,

on observe que la corrélation est plus grande sur la première réponse que la deuxième, ce qui signifie qu'il existe un effet de groupe plus important sur la première réponse.

Bilan : Ainsi, par le tracé des matrices de persistance dans le temps pour chacun des sons, nous disposons d'un critère quantitatif et visuel nous permettant de déterminer si une réponse est physiologique ou non et de localiser les réponses dans le temps.

2.2 Analyse générale de la réponse de l'échantillon

Maintenant que nous disposons d'un critère pour sélectionner les réponses physiologiques, nous allons tenter de déterminer la fonction d'un neurone considéré seul. Pour cela, nous allons étudier la réactivité de notre échantillon de neurones à un ensemble de sons dont les fréquences sont 4kHz, 8kHz ou 16kHz et à des intensités comprises entre 30 dB et 80 dB.

Approche binaire (le neurone réagit-il ou ne réagit-il pas ?) et établissement d'une matrice de réactivité des neurones en fonction des sons écoutés

La première question que nous nous posons est de savoir si un neurone s'active à l'écoute d'un type précis de son. Pour cela, nous avons observé les différentes évolutions moyennes de la fluorescence des neurones et nous nous sommes donné un critère quantitatif de sélection des cellules réactives.

Ciblant l'intervalle de temps où une réponse physiologique a lieu, nous établissons un seuil de sélection spécifique à chaque son nous permettant de dire si un neurone réagit ou non. Notre approche vise principalement à éliminer une activité neuronale qui peut être considérée comme du bruit. Nous représentons en Fig. 2.4, le seuil établi par notre algorithme sur 4 sons différents. Nous considérons qu'un neurone réagit à un son donné si son activité dépasse le seuil sur la plage temporelle où la réponse physiologique a lieu. Nous voyons que l'usage de ce seuil nous permet d'éliminer les sons dont l'activité peut être considérée comme du bruit.

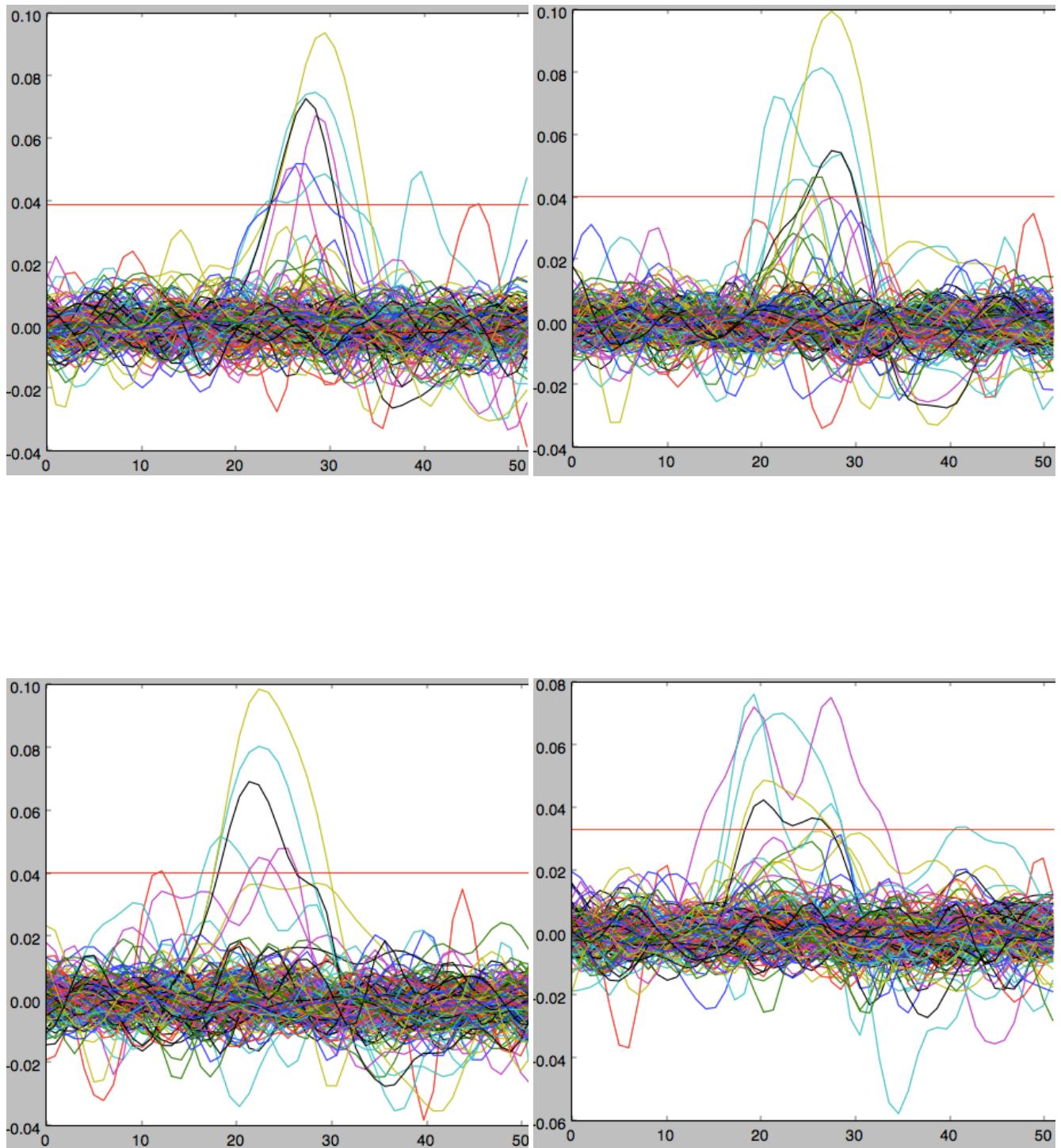


Fig. 2.4 – Représentation du seuil de sélection pour 4 sons différents

Nous synthétisons nos résultats dans une matrice binaire (0 ou 1) de taille (*nombre de cellules* × *nombre de sons*) qui recense les différents sons auxquels réagit chacun des neurones (Fig 2.5).

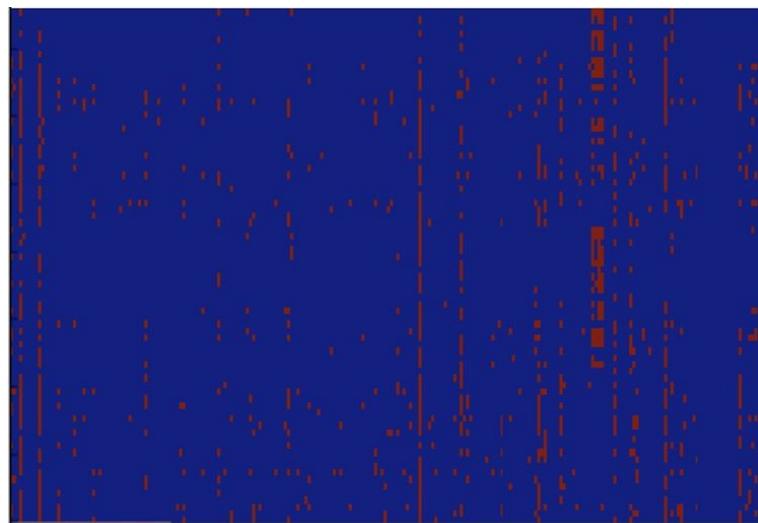


Fig. 2.5 – Matrice (rouge = 1 / bleu = 0) qui recense l’activité des neurones de l’échantillon pour chacun des sons. Les cellules sont en abscisses, les sons en ordonnées

Visuellement, on peut tirer plusieurs informations de cette matrice d’activité.

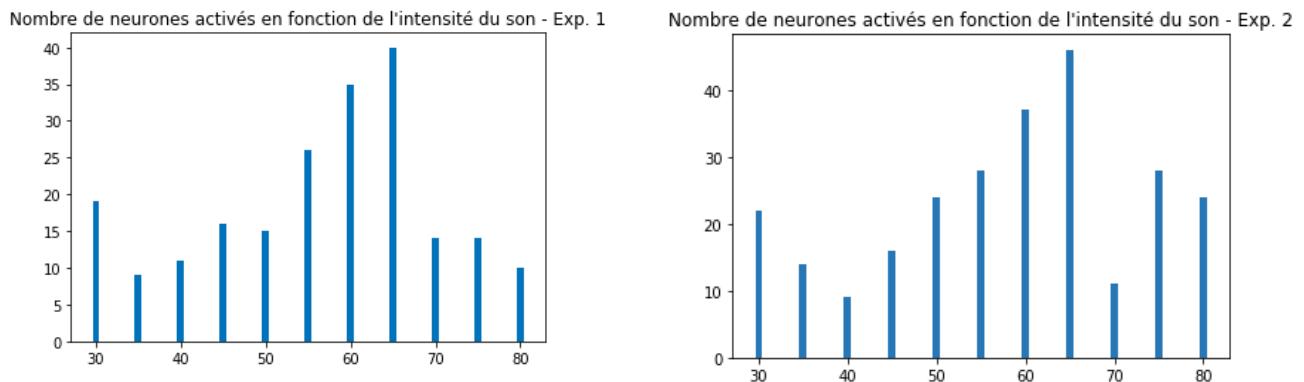
- L’activation d’une cellule n’est pas spécifique d’un son unique. Un neurone code pour plusieurs sons. Peut-on établir un lien entre les caractéristiques de ces sons ?
- Par ailleurs le nombre de sons auxquels réagit un neurone est très variable. On peut donc discriminer des neurones qui sont activés quel que soit le son écouté (ou presque) et des cellules plus spécifiques. Comment caractériser les différents types de neurones ?
- On constate sur cette matrice la présence presque systématique de « barrettes ». Cela signifie qu’un neurone est réactif pour au moins deux sons proches en ordonnée. Or, nous avons regroupé les sons semblables lors de la numérotation. On peut en déduire une régularité d’activité en fonction des caractéristiques du son écouté. Peut-on préciser cette régularité en étudiant cette matrice ?
- De plus, les sons n’activent pas le même nombre de cellules. On en déduit que certains sons nécessitent l’activation de plus de cellules que d’autres. Peut-on tisser une corrélation entre la complexité du son et le nombre de cellules activées ?

Nous allons tenter d’explorer ces pistes par la suite.

2.2.1 Etude quantitative simple : y a-t-il une corrélation entre le nombre de cellules activées et la complexité d’un son ?

Nous pouvons nous interroger sur la corrélation entre l’intensité d’un son et le nombre de neurones activés lors de sa perception. On note pour les deux souris sur lesquelles nous avons

réalisé nos mesures une tendance claire : le nombre de neurones activés augmente lorsque l'intensité augmente, avec une activité maximale en terme de nombre de neurones activés entre 60 et 65 dB.



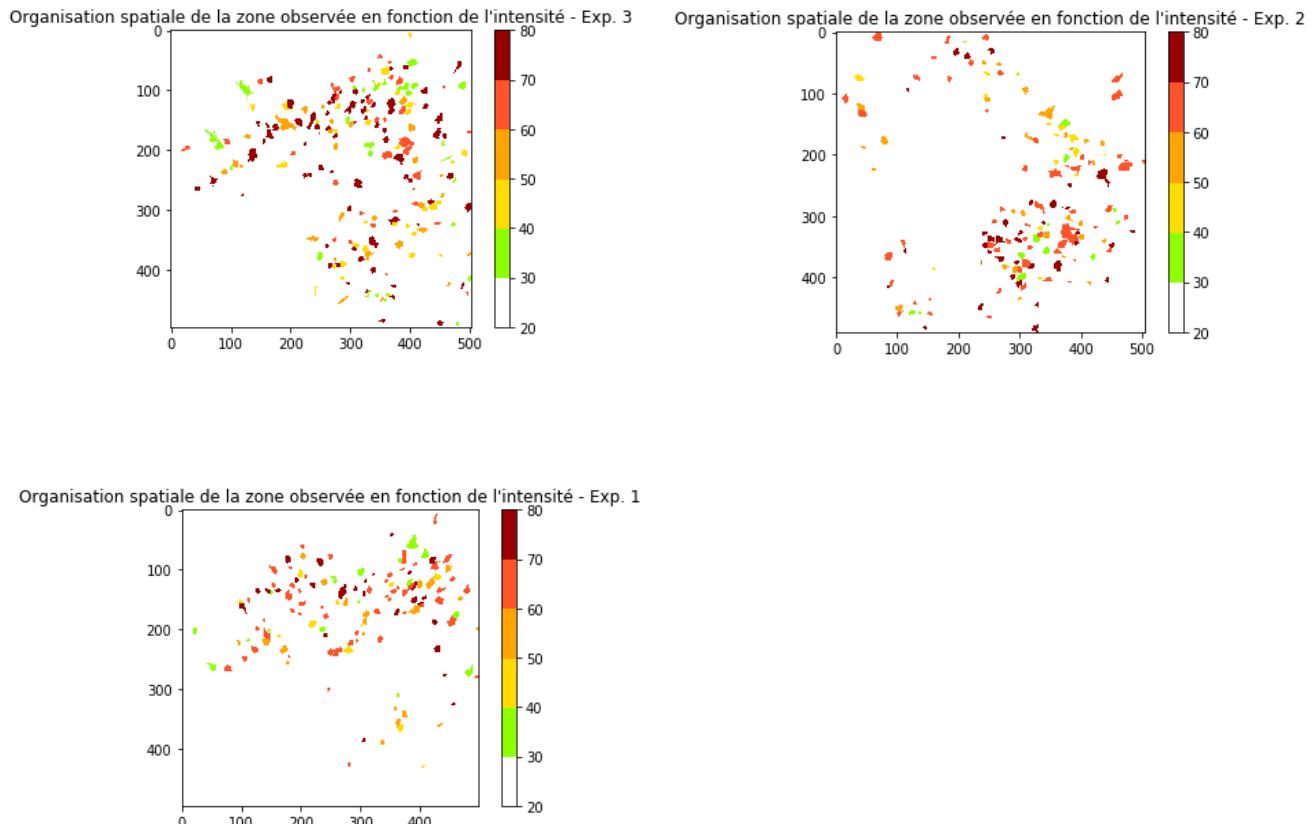
Pour autant, on peut émettre plusieurs nuances à cette corrélation croissante entre intensité sonore et nombre de neurones activés. Cette tendance croissante est en effet notable pour des sons d'intensité comprise entre 40 et 65 dB mais s'estompe pour les faibles intensités et hautes intensités.

- Cela suggère tout d'abord que le nombre de neurones activés n'est qu'une composante du codage cortical de l'intensité perçue, mais n'est pas la seule, et cela nous porte à nous intéresser plus spécifiquement aux neurones activés lors de la perception sonore.
- On peut noter que le codage de sons à très faible intensité (30 dB) requiert un nombre important de neurones, du moins plus important qu'à 40 ou 45 dB. L'existence de ce surplus de neurones nous conduit à supposer qu'il existe des neurones spécifiques, nécessaires à la perception de sons de basses intensités. Chez des souris malentendantes, ceux-ci pourraient être dysfonctionnels, et envisager de les réhabiliter permettrait de pallier ce défaut d'audition.
- On constate enfin une diminution du nombre de neurones activés lorsque l'intensité dépasse un seuil de 70 dB. On peut supposer que cette diminution correspond à une perte de sensibilité à haute intensité, ce qui se traduit par un moindre nombre de neurones activés. Des neurones qui seraient par exemple spécialisés dans l'analyse de la fréquence ou du timbre du son ne sont peut-être plus sollicités lorsque l'intensité du son est trop élevée.

Les mêmes neurones sont-ils activés par des sons d'intensité distinctes ? Comment s'organisent spatialement les cellules corticales en fonction de leur réponse préférentielle à une intensité donnée ?

2.3 Organisation spatiale de l'aire corticale observée

2.3.1 Étude spatiale du codage de l'intensité



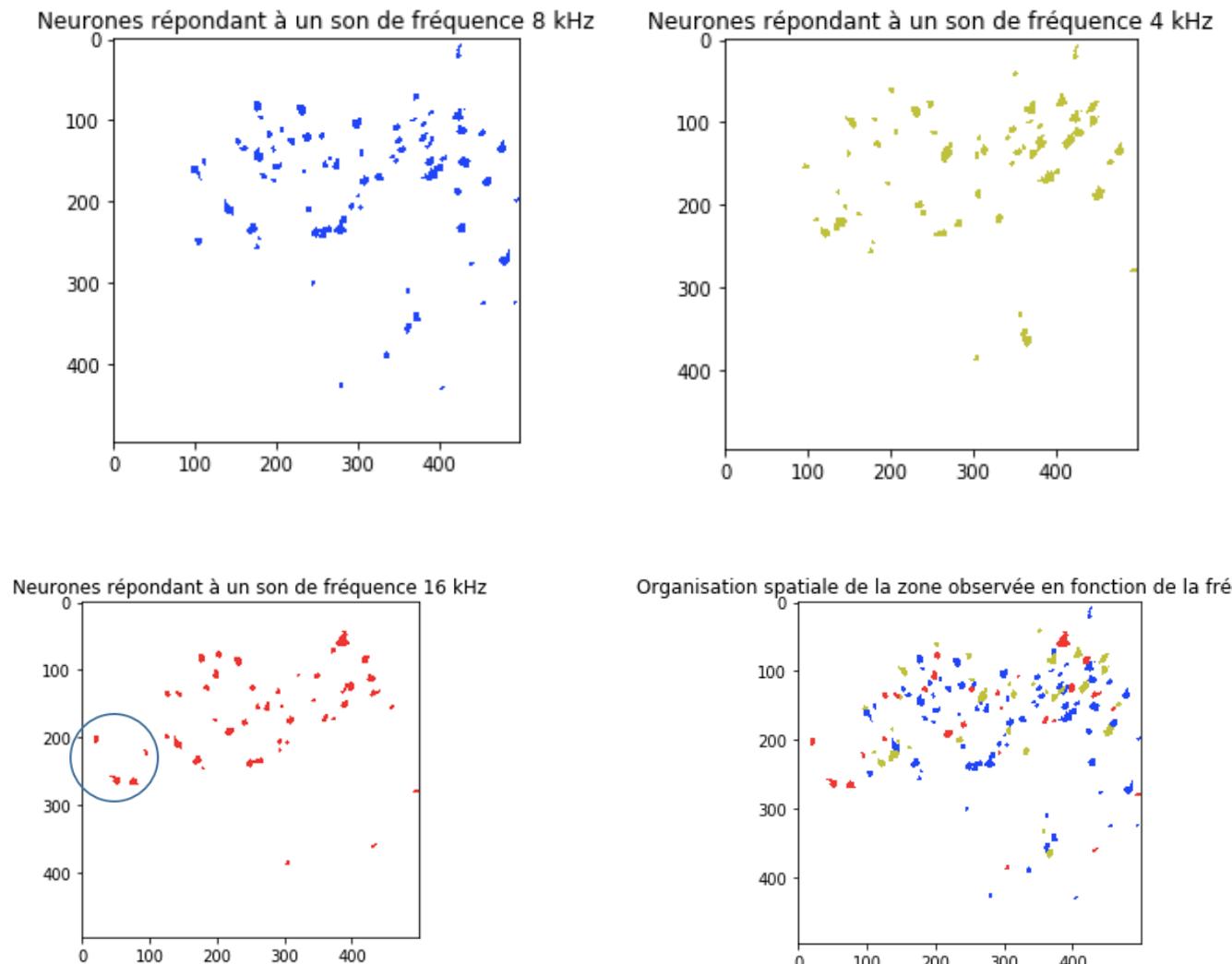
Il est possible d'identifier des neurones activés préférentiellement lors de la perception d'une certaine gamme d'intensité sonore. Au regard des trois expériences réalisées, la réponse préférentielle des neurones à une gamme d'intensité donnée ne répond pas à une organisation spatiale claire, et leur répartition au sein de la zone corticale observée semble plutôt hétérogène. Sur les images ci-dessus, les neurones en vert ne sont actifs que pour des sons de 30 et 35 dB. On peut donc noter qu'il existe des neurones spécifiques des sons de basse intensité.

2.3.2 Cartographie neuronale en fonction de la fréquence

Influence générale de la fréquence

Nous pouvons ensuite nous intéresser à l'organisation spatiale des neurones en fonction de leur sensibilité à une fréquence donnée. On sait que les cellules ciliées qui créent le signal nerveux au niveau de la cochlée sont organisées spatialement, de sorte que les cellules répondant à la même gamme de fréquences sont proches géographiquement dans la cochlée. C'est pourquoi il est

intéressant de se demander si cette organisation spatiale, communément nommée « tonotopie » se retrouve dans le cortex, sous la forme d'aire spécifique de fréquences donnée.



En utilisant les critères de sélection énoncés précédemment et la matrice binaire obtenue, nous obtenons la liste des cellules réagissant préférentiellement à chacune des trois fréquences testées : 4, 8 et 16 kHz. On peut alors obtenir une cartographie de la zone corticale considérée, affichant pour chaque fréquence les neurones qui réagissent préférentiellement aux sons de cette fréquence.

Les images obtenues nous montrent qu'il n'y a pas à l'échelle corticale d'organisation spatiale globale des neurones en fonction de la fréquence à laquelle ils réagissent principalement. Néanmoins, en se concentrant sur de petits domaines de l'aire corticale observée, on note que des neurones adjacents partagent souvent une réponse à une même fréquence. Cela suggère un comportement de groupe ou une connexion synaptique forte entre ces neurones proches [8][9][10].

On peut identifier des micro-domaines spécifiques de certaines fréquences : l'aire entourée en bleu ci-dessus est une zone spécifique des hautes fréquences, qui n'est pas activée par des stimu-

lations à 4 et 8 kHz. Dans le cadre d'une tentative de réhabilitation artificielle de la perception sonore par stimulation neuronale directe, on identifie ainsi une zone à stimuler pour simuler un son aigu.

Modulation de la carte fréquentielle en fonction de l'intensité

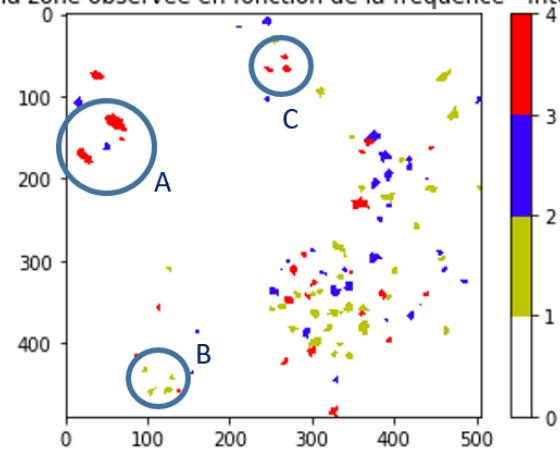
Enfin, dans l'optique de réhabiliter la perception sonore, il importe d'étudier la modification de la cartographie de la zone corticale étudiée lorsque l'intensité du son perçu baisse. C'est pourquoi, nous avons tenté d'identifier les neurones réagissant préférentiellement aux différentes fréquences comme fait précédemment, mais en séparant cette fois-ci deux gammes d'intensité : basse (de 30 à 45 dB) et haute (de 65 à 80 dB).

Il apparaît que la perception des sons de haute fréquence est plus altérée par une baisse de l'intensité sonore que les sons de basses fréquences. En effet, on compte plus de neurones activés par des sons à 4 kHz dans la gamme d'intensité basse. Au contraire, on constate que le nombre de neurones activés par des sons à 16 kHz est plus faible à basse intensité.

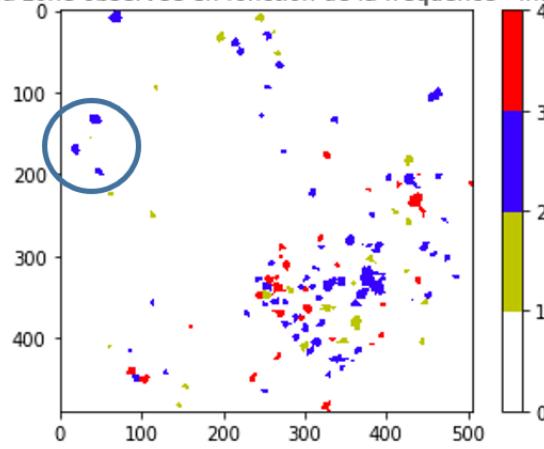
On constate de plus que les cartes obtenues diffèrent, suggérant que la carte fréquentielle de la zone corticale n'est pas indépendante de l'intensité. Ainsi, une aire répondant préférentiellement aux sons aigus de haute intensité peut répondre préférentiellement aux sons graves si l'intensité du son est plus faible. Considérons quelques exemples :

- La zone notée A correspond à basse intensité à des neurones préférentiellement activés par des sons aigus, alors qu'à haute intensité, la gamme de fréquence pour lesquelles ils réagissent s'élargit et s'étend vers des fréquences plus basses.
- On identifie à basse intensité des zones B et C qui semblent spécifiques des sons graves (B) et aigus (C). Or, à haute intensité, la spécificité de ces domaines n'est plus évidente.

Organisation spatiale de la zone observée en fonction de la fréquence - Intensité 30-45 dB - Exp. 2



Organisation spatiale de la zone observée en fonction de la fréquence - Intensité 65-80 dB - Exp. 2



Chapitre 3

Analyse fonctionnelle des neurones

Nous allons désormais tenter de préciser la fonctionnalité des neurones et décrypter des régularités dans le codage neuronal.

3.1 Analyse fonctionnelle de la réactivité d'un neurone

Repartant de la matrice binaire obtenue en **Fig. 2.5**, nous pouvons discriminer les cellules réactives à un grand nombre de sons et les cellules plus spécifiques. Ci-dessous sont représentées les matrices de corrélation (au sens du coefficient de Pearson) des réactions fluorescentes moyennes de 4 cellules aux 33 sons harmoniques écoutés (les sons sont ordonnés de 30 à 80 dB où chaque intensité est couplée aux fréquences 4, 8 et 16 kHz).

- On constate tout d'abord qu'une grande partie des neurones observés sont inactifs à l'écoute de ces sons harmoniques. Cela signifie que ce sont des neurones qui ne réagissent pas lors de notre expérience ou qu'ils codent pour une autre caractéristique sonore.
- On peut noter que 7 neurones réagissent à plus de 16 sons (et 9 entre 12 et 16 sons). On peut donc considérer que ces neurones sont des noeuds du réseau neuronal. En terme de fonctionnalité, on peut suggérer deux hypothèses quant à leur rôle :
 - Ce sont des neurones de transmission par lesquels la transmission électrique doit se faire.
 - Ils jouent le rôle de déclencheurs de l'activité électrique : comme des montages électroniques non-linéaires qui démarrent sur le bruit, ces neurones peuvent avoir pour rôle de permettre le démarrage de l'activité des autres neurones. Ils délivrent ainsi une décharge électrique à plusieurs neurones quelque soit le son entendu.
- Enfin, 64 neurones ont une activité très spécifique et ne s'activent que pour au plus 7 sons.

Etudions plus en profondeur les réactions de chacun de ces groupes de neurones aux différents sons.

3.1.1 Neurones réagissant à presque tous les sons

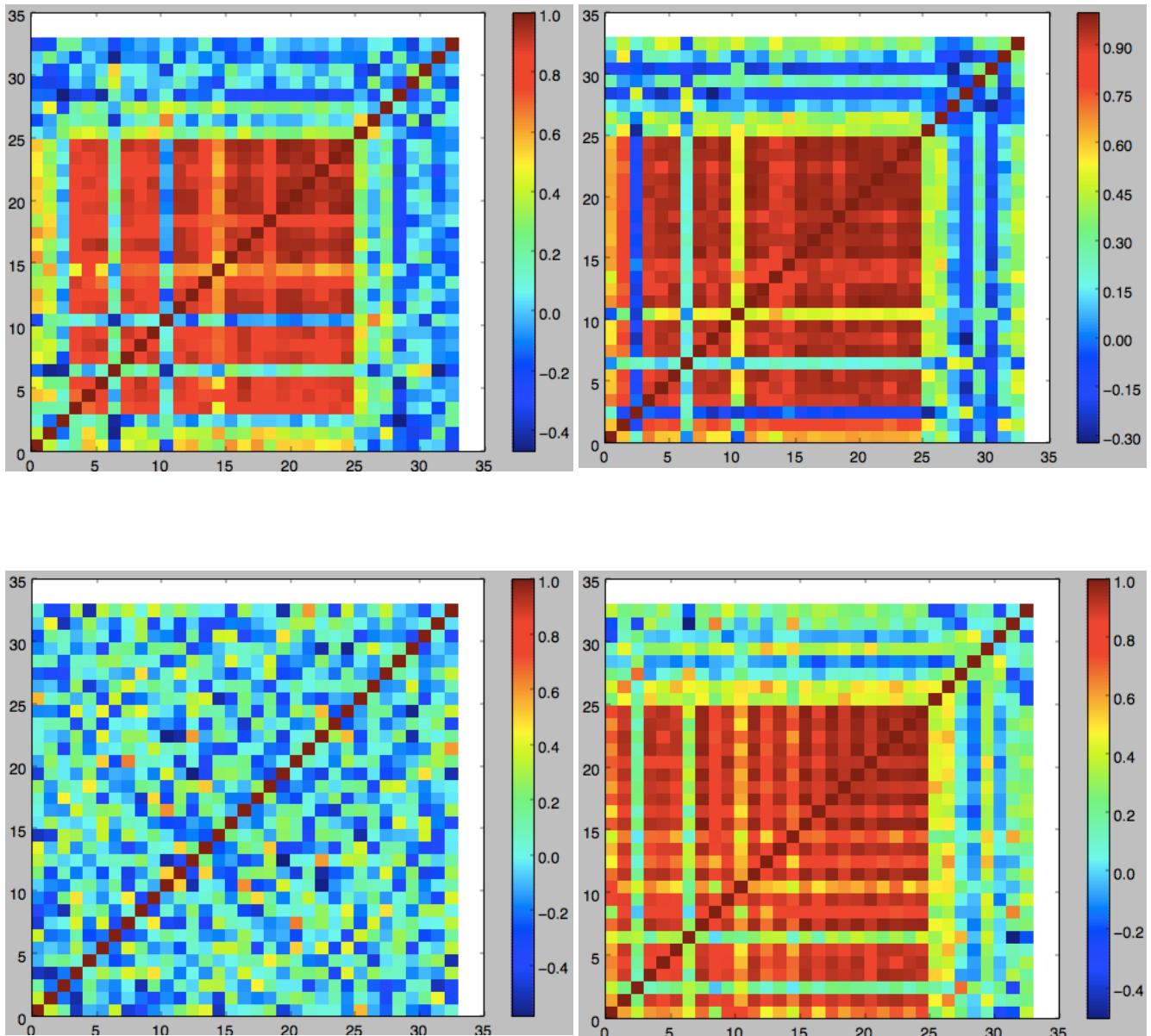


Fig. 3.1 - Matrice de corrélation des réactions fluorescentes moyennes de 4 cellules aux 33 sons harmoniques écoutés (les sons sont ordonnés de 30 à 80 dB où chaque intensité est couplée aux fréquences 4, 8 et 16 kHz)

Pour étudier plus spécifiquement ces neurones, sortons de l'approche purement binaire en quantifiant les réactions fluorescentes de ces cellules. Pour déterminer si leur réaction est identique sur chacun des signaux, étudions la similarité entre des réactions d'un même neurone à l'écoute des différents sons. Sont présentés les résultats obtenus sur 4 cellules en **Fig. 3.1**

Ces matrices nous apportent plusieurs informations :

- Sur l'ensemble des cellules réagissant quantitativement à plus de 12 sons (16 cellules), la moitié des matrices de corrélation observées sont analogues à celle de la cellule figure en bas à gauche). Il n'y a aucune corrélation entre les signaux observés pour les différents sons.

Cela suggère que la cellule ne répète pas un même comportement à l'écoute des différents sons et n'est donc pas assez fiable pour être prise en compte dans l'étude.

- Cependant, on découvre une reproductibilité remarquable des comportements sur l'autre moitié des cellules considérées. En effet, les autres figures montrent une très forte corrélation des réactions des neurones aux différents sons écoutés. Cela suggère que le neurone adopte un comportement identique et donc indifférencié pour l'écoute de n'importe quel son. Cela confirme l'idée que **certains neurones s'activent sur une grande gamme d'intensité et sont donc potentiellement des noeuds du réseau neuronal**.
- En observant les matrices de similarité des cellules fiables, on constate qu'à partir du son 25 (donc des sons d'intensité supérieure à 65 dB), on perd la corrélation observée. Cela peut traduire l'existence d'une saturation du neurone à l'écoute de sons de trop forte intensité. De plus, on observe sur la figure en haut à gauche, que la cellule considérée perd son activité cohérente pour des intensités inférieures à 30dB.

Bilan : On tire de l'étude de ces quelques cellules des informations qui peuvent être importantes dans notre caractérisation fonctionnelle (et dans l'étude des défauts d'audition). On constate qu'il existe des neurones qui jouent un rôle de noeud dans le codage neuronal (dont la fonction ne fait l'objet que d'hypothèses). De plus, il semble que leur activité est limitée pour les intensités trop élevées ou trop faibles. Cette information pourra être utile dans la suite pour la caractérisation des défauts d'audition.

3.1.2 Neurones dont l'activité est spécifique à l'écoute de quelques sons

Dans notre échantillon, nous avions compté 64 neurones dont l'activité était non négligeable et ne réagissant qu'à un petit nombre de sons (moins de 7). Nous allons étudier leurs comportements pour préciser leurs fonctions.

En étape préliminaire, il est encore nécessaire de nettoyer notre jeu de données. En effet, pour certaines des cellules considérées, il est difficile de déceler une quelconque activité spécifique. Aucun signal ne se dégage en terme d'intensité et aucun des signaux n'est corrélé, de sorte que l'on peut assimiler ces réactions à du bruit.

Cependant, nous parvenons à recueillir 18 neurones dont l'activité est étudiable. Avec ceux-ci, nous étudions l'évolution du maximum d'intensité de l'évolution moyenne des signaux en fonction de l'intensité du son écouté à une fréquence donnée.

Les résultats obtenus pour 2 cellules sont représentés **Fig 3.1**.

Les graphes représentés en **Fig. 3.1** montrent que les neurones ne réagissent pas de la même façon selon l'intensité du son perçu. On constate une forme de spécification à une gamme d'intensité. Par exemple, le neurone correspondant à la figure du dessus semble être spécialisé dans l'écoute des sons autour de 65dB. L'observation se confirme lorsqu'on analyse la matrice de corrélation entre la moyenne des signaux temporels. On constate qu'il y a une forte corrélation entre les signaux à l'écoute des sons entre 16 et 24, ce qui correspond dans notre numérotation aux sons d'intensité comprise entre 55 et 65 dB. Cette corrélation traduit le fait qu'à ces intensités, le pic observé n'est pas analogue à du bruit, mais bien le fruit d'une réponse qui se répète.

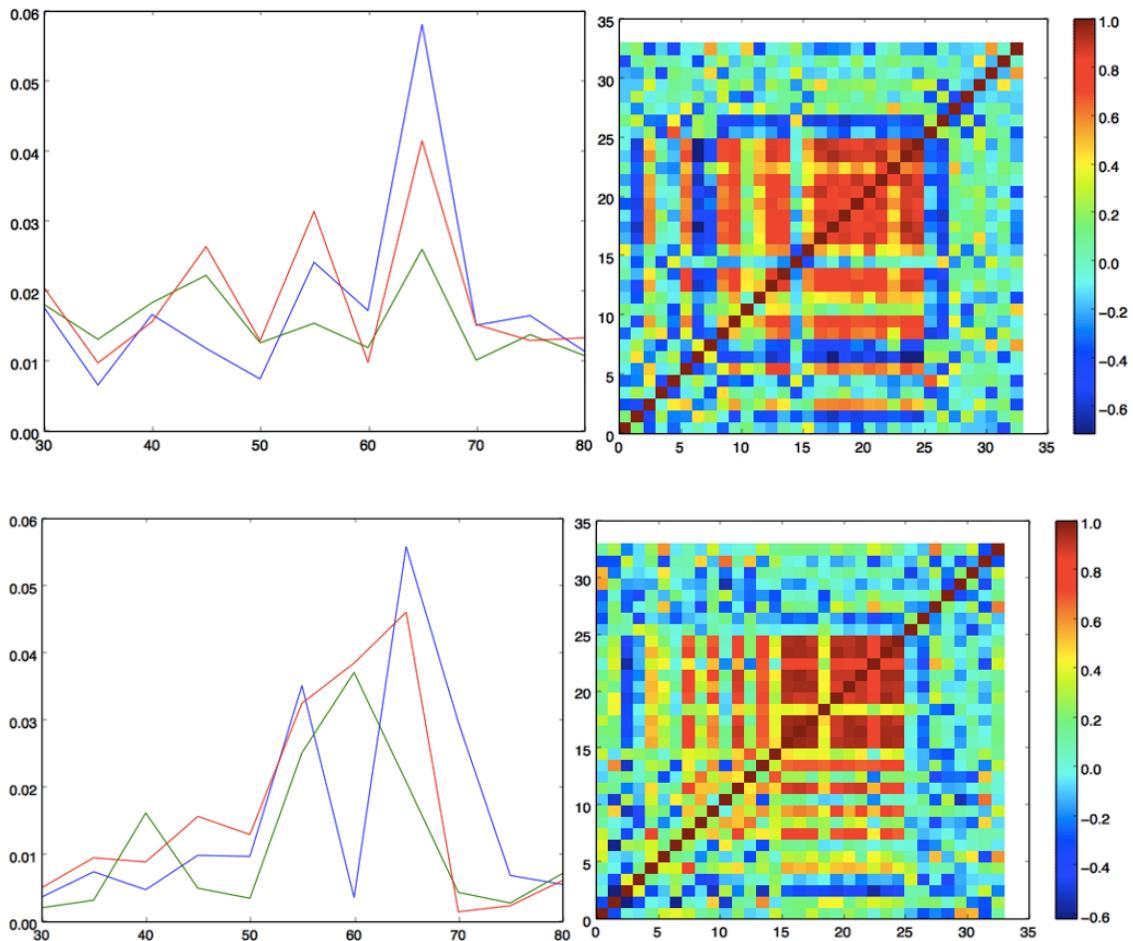


Fig. 3.1 – Evolution du maximum de fluorescence de l'évolution moyenne d'une cellule en fonction de l'intensité (à fréquence fixée : rouge=8kHz, bleu=16kHz, vert=4kHz), et matrice de corrélation de l'évolution moyenne dans le temps des signaux obtenus à l'écoute des différents sons

Cependant, à la vue de ces courbes, il ne semble pas y avoir de spécificité sur la fréquence. Aucune régularité n'est observée quant au fait qu'une fréquence donnée provoquerait une plus grande réaction chez une cellule que d'autres fréquences.

Bilan : Il semble exister une spécificité des neurones pour certaines gammes d'intensité, indépendamment de la fréquence. Cependant, on sait bien que le codage a réellement du sens dans le cadre d'un réseau neuronal très vaste. Il est donc assez réducteur de se limiter à l'étude de neurones considérés individuellement. Nous allons donc tenter d'étendre notre étude à la recherche d'activités de groupe.

3.2 Clusters de neurones

Nous avons, dans un premier temps, considéré l'étude des réactions neuronales à l'échelle d'un seul neurone. Nous avons constaté le fait que certains neurones codaient pour presque tous les sons écoutés, formes de neurones d'activation, alors que d'autres étaient spécifiques de l'étude d'un seul type de son.

Nous allons étendre notre analyse en essayant de déterminer si les neurones en question réagissent en groupe. En effet, nous savons que les neurones s'organisent en réseau. Une réponse purement individuelle ne peut donc être étudiable.

Nous allons tenter de regrouper les neurones par groupes en comparant les réponses (toujours sous le prisme de la corrélation de type Pearson) pour chacun des sons.

Etant donné les grandes variations dans les réponses neuronales, nous n'espérons pas obtenir des groupes de réponse précis. Cependant, nous voulons déterminer s'il existe des tendances de regroupements de cellules de sorte à décrire plus en détail les fonctions du réseau neuronal.

3.2.1 Contours du problème

Nous sommes face à un problème de clustering en dimension élevée (240 cellules représentées chacune par un vecteur d'évolution temporelle de 51 points). Etant donné les résultats de la partie 1, nous choisissons à nouveau de considérer l'évolution moyenne dans le temps des neurones établie sur l'ensemble des répétitions. Nous souhaitons donc à présent regrouper les neurones selon la similitude de leurs réactions temporales.

Nous disposons d'un jeu de données sur lequel nous ne connaissons que peu d'informations. En outre, le nombre total de groupes que nous voulons former est inconnu. Il nous faut donc avoir recours à un algorithme de clustering de type non-supervisé.

Nous avons testé puis adopté l'algorithme de " Regroupement Ascendant Hiérarchique " (CAH). Nous décrivons son principe dans le cadre de notre problème en **Annexe B**.

3.2.2 Regroupement ascendant hiérarchique

L'algorithme de CAH considéré nous permet de tracer un dendrogramme qui regroupe les neurones puis groupes de neurones selon leur ressemblance (au sens de la norme algébrique considérée).

A partir de ce dendrogramme, nous fixons un seuil (empirique) qui nous semble au mieux traduire les regroupements entre les cellules. Voici en **Fig. 3.2**, les dendrogrammes obtenus pour notre jeu de données sur l'écoute de deux sons différents.

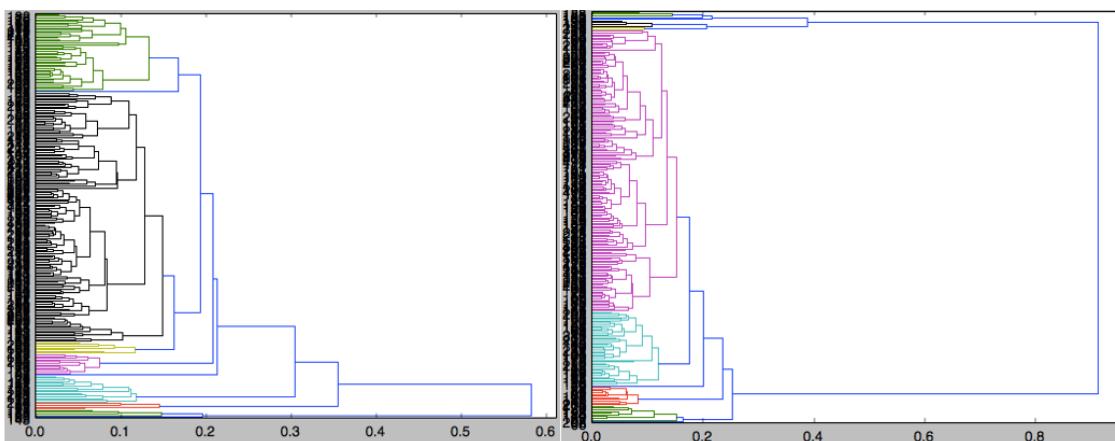


Fig. 3.2 – Dendrogramme obtenus pour l'écoute de deux sons différents. Sont représentés en couleurs les clusters choisis à partir du seuil empirique

Nous voyons qu'il n'est pas évident de choisir le seuil pour décider à partir de quel noeud nous pouvons considérer que des neurones ont une réactivité semblable.

Pour tester la validité potentielle de notre algorithme, nous affichons la matrice de corrélation des réponses moyennes de nos neurones (nous ordonnons les neurones par cluster en abscisse et en ordonnée de sorte à voir apparaître des " carrés " de forte corrélation par cluster, voir **Annexe B**). Voici les résultats obtenus pour les deux dendrogrammes précédents (**Fig. 3.3**) :

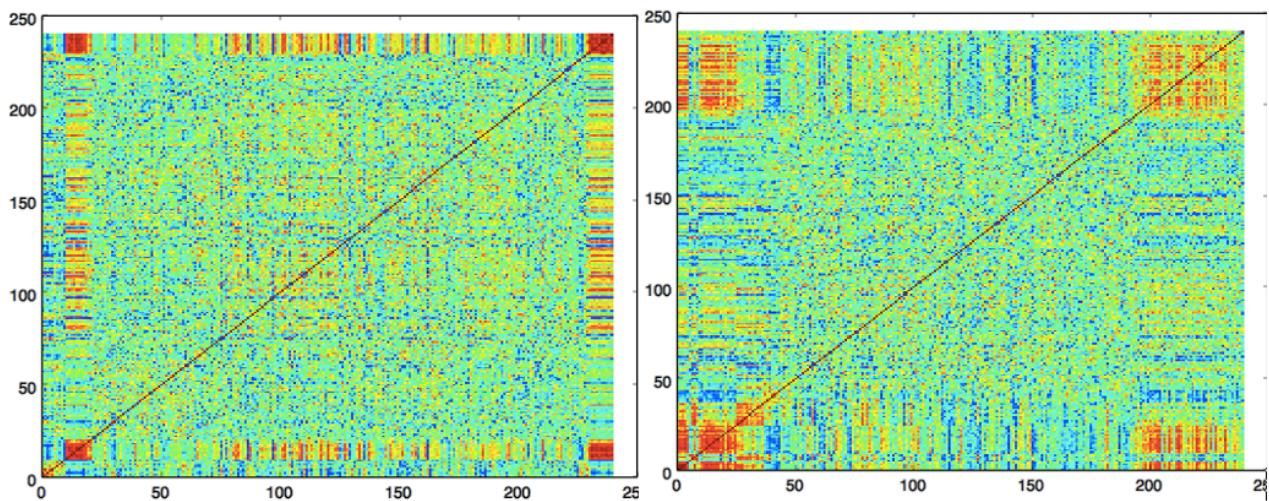


Fig. 3.3 – Matrice de corrélation des réponses moyennes des neurones pour deux sons particuliers

Nous émettons plusieurs remarques à la lecture de ces matrices de corrélation :

- Nous constatons que notre algorithme regroupe correctement les neurones en tentant de maximiser leur similitude de réponse. On constate sur la Fig. 3.3 de gauche, qu'un certain nombre de cellules pourrait être ajouté au cluster en bas à gauche et au cluster en haut à droite (barrettes de couleur rouge). De plus, l'algorithme a eu tendance à séparer ces deux clusters alors que nous pouvons considérer que leur réponse est similaire (en effet, on constate en bas à droite que leur corrélation est forte).
- De même sur la figure Fig. 3.3 à droite, on constate que sont séparés des clusters qui pourraient être regroupés ensemble. Une optimisation de notre algorithme peut donc être apportée.
- Enfin, on constate qu'une grande partie des cellules appartient à un cluster d'inactivité. Leur coefficient de corrélation avec l'ensemble des autres cellules est très faible. Il s'agit très certainement des cellules rencontrées dans la première partie dont le signal était très faible et indistinguable du bruit.

Bilan : Cette première utilisation du regroupement hiérarchique confirme notre idée initiale : le comportement des neurones n'est pas individuel. En effet, l'existence de groupes regroupant plusieurs dizaines de cellules dont la réponse est analogue montre l'existence de réponses groupées. Afin d'améliorer notre regroupement, conscients du parasitage de notre jeu de données par des " neurones bruit ", nous décidons d'améliorer notre clustering en nettoyant le jeu de données.

3.2.3 Résultats après nettoyage de notre jeu de données

Utilisant la même méthodologie que dans la partie précédente, nous sélectionnons les 79 cellules dont les réponses se distinguent du bruit. Nous allons recommencer le même procédé de clustering sur l'ensemble de ces cellules. Nous espérons que le jeu de données ainsi nettoyé, il sera plus facile de regrouper les cellules. Voici les dendrogrammes et les matrices de corrélation ainsi obtenus (les deux premiers sons considérés sont les mêmes que ceux de la **Fig. 3.3**) :

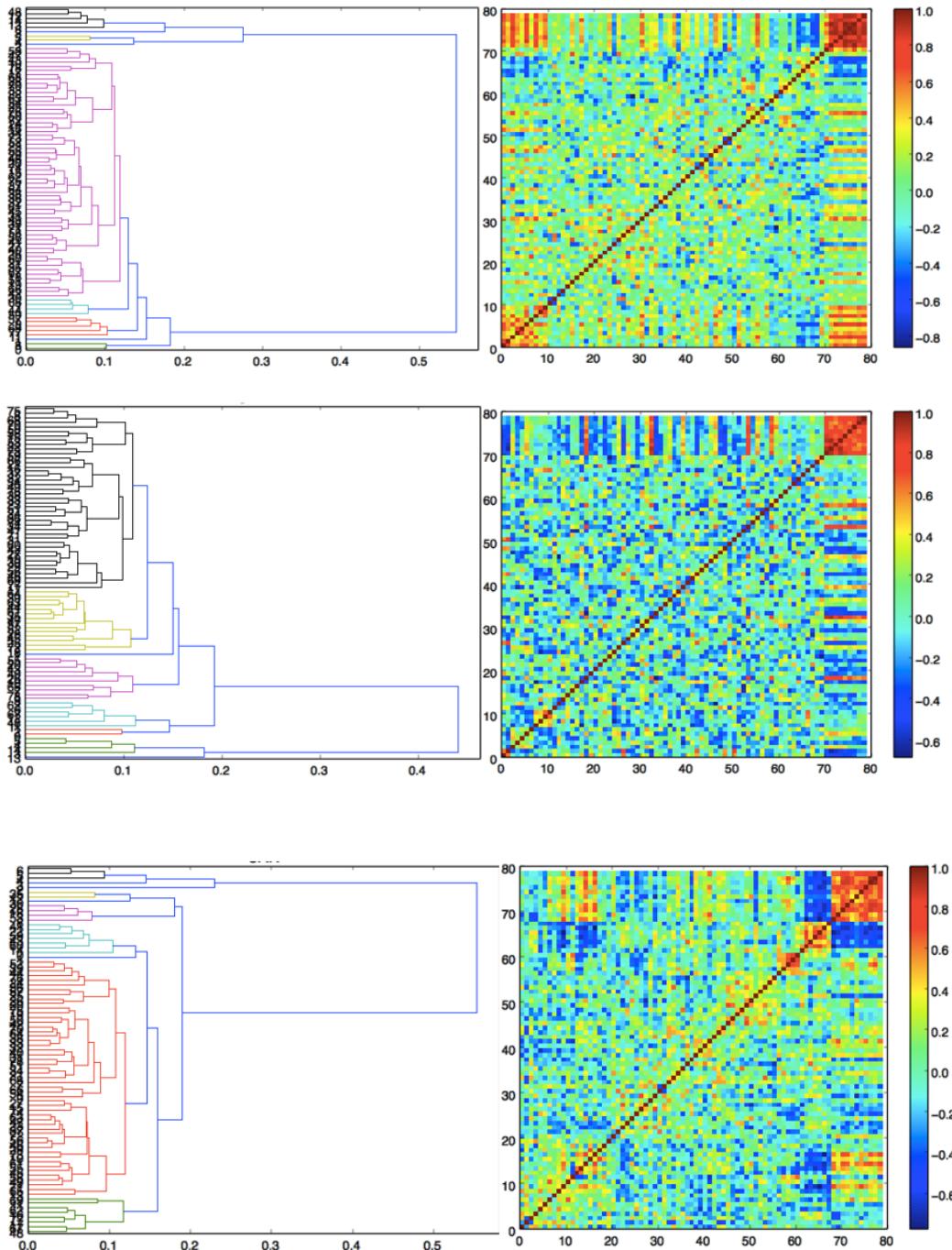


Fig. 3.4 – Dendrogrammes et matrices de corrélation obtenus sur 3 sons suite à l'application d'un CAH sur notre jeu de données nettoyé

Nous voyons sur ces figures que pour chacun des sons (ces trois exemples sont assez significatifs de l'ensemble des matrices de corrélation que l'on obtient sur tous les sons), il existe un groupe d'environ 10 neurones dont l'activité est similaire. A nouveau, on constate que le groupe de forte corrélation (carré rouge) est incomplet. Cependant, comme notre jeu de données est ici d'une taille assez petite, nous pourrons compléter par la suite le cluster de forte corrélation à la main.

Nous pouvons noter qu'il est remarquable de constater que les neurones se séparent en deux groupes :

- Celui correspondant à la forte corrélation : tous les neurones ont une réponse du même type
- Le groupe regroupant le reste des neurones dont l'activité ne corrèle avec aucun autre

Nous nous retrouvons donc dans une situation binaire : ou bien le neurone réagit en corrélation avec un groupe de neurone réactif ; ou bien le neurone réagit de façon isolée et a priori aléatoire.

Il est difficile de tirer des conclusions sur l'ensemble des neurones réagissant de manière décolorée. Nous aurions tendance à émettre deux hypothèses :

- Le neurone n'appartient pas à une couche de neurones particulière qui code pour la fréquence ou l'intensité du son joué. Il peut coder pour une autre propriété du son ou réagir indépendamment des autres
- Les conditions de l'expérience font que le neurone n'a pas présenté d'activité significative.

A des fins de comparaison, nous avons testé notre algorithme sur un jeu de données utilisé par le laboratoire UNIC pour l'une de ses publications[4]. Nous voyons (**Fig. 3.5**) que sur ce jeu de données, les neurones s'organisent en plusieurs clusters de réponses : cela signifie que sur l'intervalle de temps durant lequel le son est joué, plusieurs groupes de neurones adoptent des réponses particulières. Même si le son joué ici est plus complexe que les nôtres (son d'intensité croissante), on constate une organisation en plusieurs clusters, chacun étant associé à un type précis de réponse.

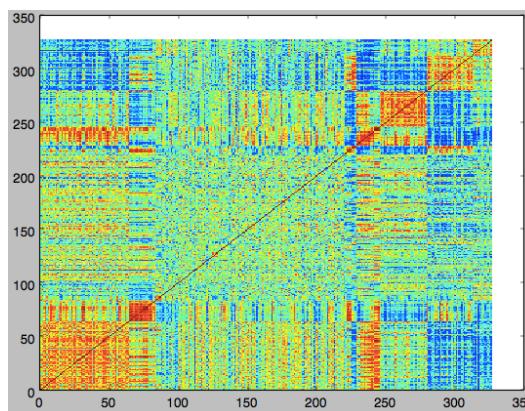


Fig. 3.5 – Matrice de corrélation obtenue après application du CAH à un jeu de données utilisé par le laboratoire UNIC pour une de ses publications

On peut donc considérer que l'ensemble des neurones n'appartenant à aucun cluster de forte corrélation lors de notre expérience n'a pas bien réagi lors de l'expérience. Nous espérons cepen-

dant obtenir une idée de l'organisation du réseau neuronal à partir de l'étude des autres cellules réactives.

3.2.4 Détermination des clusters de fonctionnalité sur l'ensemble des cellules réactives

A partir des matrices précédemment établies, nous avons pu éliminer les neurones qui ne participaient à aucun cluster de forte corrélation. On est ainsi amené à étudier un échantillon de 46 cellules.

Dans la mesure où les matrices de corrélation nous apportaient un point de vue binaire (participation à un cluster de forte corrélation ou réaction individuelle décorrélée de toutes les autres), nous décidons de prendre pour critère : le neurone code pour le son considéré s'il participe à un cluster de forte corrélation à l'écoute de ce son. Selon ce principe, nous réalisons un crible qui recense pour chaque cellule l'ensemble des sons pour lequel elle code. Le crible ainsi obtenu est représenté en **Fig. 3.6** :

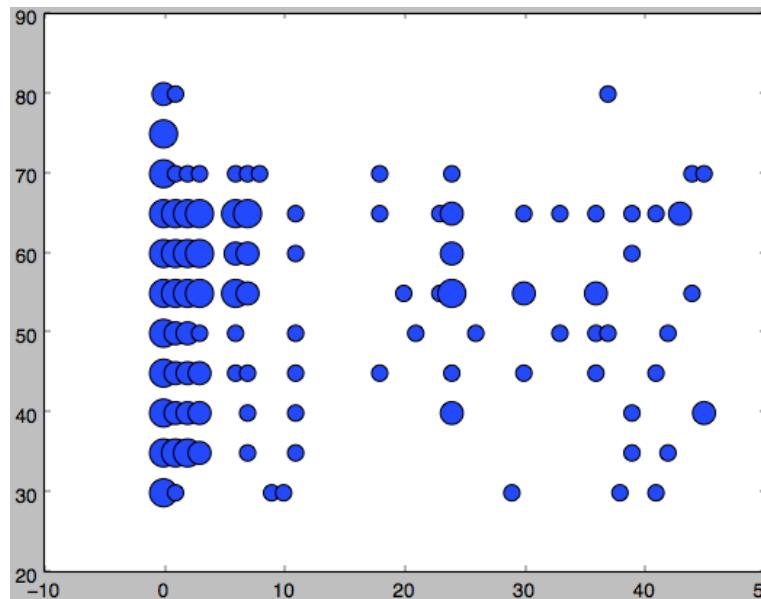


Fig. 3.6 – Crible des réponses des 46 cellules étudiées aux différentes intensités (les cellules en abscisse numéroté de 0 à 45, l'intensité (en dB) en ordonnée de 30 à 80). L'épaisseur des points est quantifiée selon l'intensité de la réponse)

La **Fig. 3.6** représente le crible considérant l'ensemble des cellules. Cette carte sonore nous apporte une première information notable. Il semble y avoir une corrélation entre le nombre de neurones codant et la qualité de la sensation auditive. En effet, on constate qu'il y a une plus grande densité de neurones codant dans l'intervalle [45dB-70dB], ce qui correspond à l'intervalle d'intensité où l'audition est aisée pour la souris. A l'inverse, pour les trop faibles et surtout trop fortes intensités, peu de neurones réagissent. Cela peut s'interpréter comme une saturation des neurones qui ne parviennent donc plus à analyser le son écouté. On peut même ajouter que le codage semble plus facile pour des sons de faible intensité que pour des sons de forte intensité. Cela semble bien correspondre à une sensation que nous éprouvons.

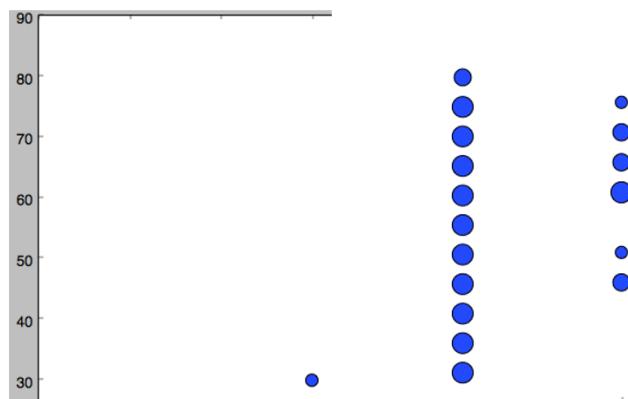


Fig. 3.7 – Crible des réponses de 3 cellules isolées

Pour faire une étude plus spécifique, nous travaillons à présent sur les figures du type de celles **Fig. 3.7** qui présentent les résultats du crible pour une cellule isolée.

A partir de ces cartes sonores, nous avons spécifié pour chacune des 46 cellules les intervalles d'intensité où elle réagit spécifiquement. Alors nous avons regroupé les cellules ainsi (**Fig. 3.8**) :

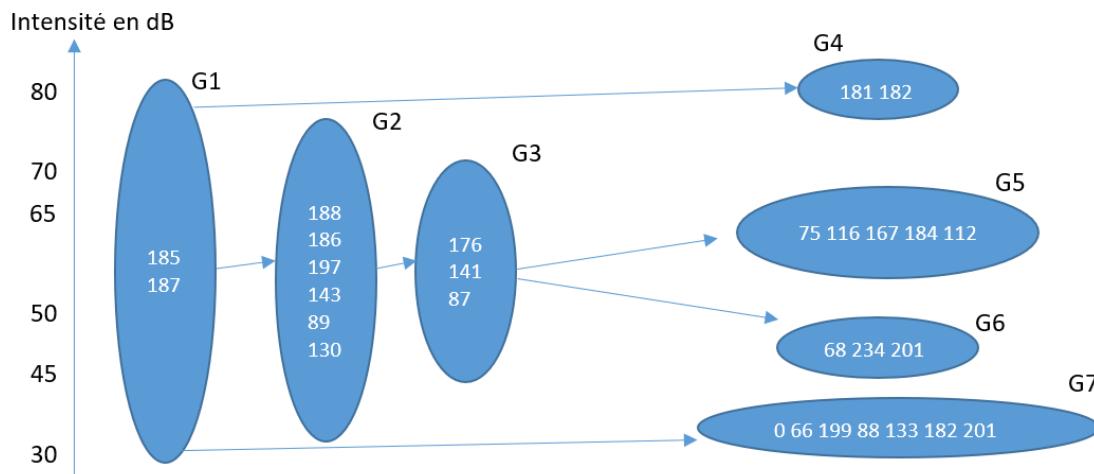


Fig. 3.8 – Proposition d'organisation du réseau de neurone en groupes de fonctionnalité par rapport à l'intensité (le numéro correspond à la numérotation des cellules, établi lors de l'étape de cliquage en partie I)

Nous avons réorganisé les neurones à partir de leurs cartes sonores en groupes de réactivité. Nous avons regroupé les neurones selon les gammes d'intensité auxquelles ils réagissent. Ainsi, pour un son à 30dB, ce sont les groupes G1 et G7 qui réagissent (avec une activité corrélée). Pour un son à 65 dB, ce sont les groupes G1, G2, G3 et G5 qui réagissent ensemble.

Nous pouvons ainsi spécifier le rôle de chacun de ces groupes :

- On peut considérer que dans le codage neuronal, les groupes G1, G2, G3 ont un rôle peu spécifique. Ils réagissent à la majeure partie des sons et ne codent pas de façon spécifique. On peut toutefois noter que le groupe G3 est restreint à la gamme [45dB ,70 dB] où la sensation auditive est meilleure. On peut donc considérer que ce sont des neurones importants au raffinement de la perception auditive. Cette sensation est ensuite elle-même raffinée

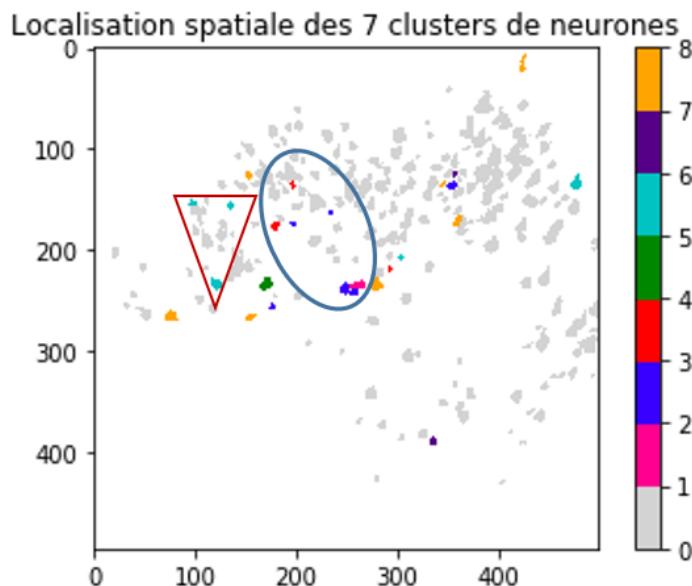
grâce au codage des groupes G5 et G6 spécifiques d'une gamme précise de fréquence.

- On constate qu'il existe un groupe de neurones (G7) codant spécifiquement à 30dB. On peut émettre l'hypothèse qu'il code pour la perception de sons difficiles à entendre.
- Enfin, il existe un groupe G4, dont le codage est spécifique des sons de très haute intensité.

Bilan de notre étude : En observant les différentes cartes de son de chacun des neurones, nous avons pu déterminer différents groupes de fonctionnalité. Chacun est actif pour une certaine gamme d'intensité. On peut alors avancer des hypothèses sur la fonctionnalité de ces clusters dans le codage neuronal. La présence de neurones spécifiques à 30 dB suggère qu'ils participent par exemple à la perception des sons de très basse intensité. De même, le groupe G1 qui est actif pour tous les sons semble être primordial à l'activité auditive. En effet, tous les neurones actifs pour un son réagissent sur le même modèle que le signal des neurones de G1. De fait, il peut s'agir de neurones nécessaires à toute activité du cortex auditif.

3.2.5 Organisation spatiale des clusters identifiés

Nous pouvons nous demander si à cette classification en termes de caractéristiques fonctionnelles correspond une organisation spatiale particulière. Peut-on identifier géographiquement ces différents clusters ?



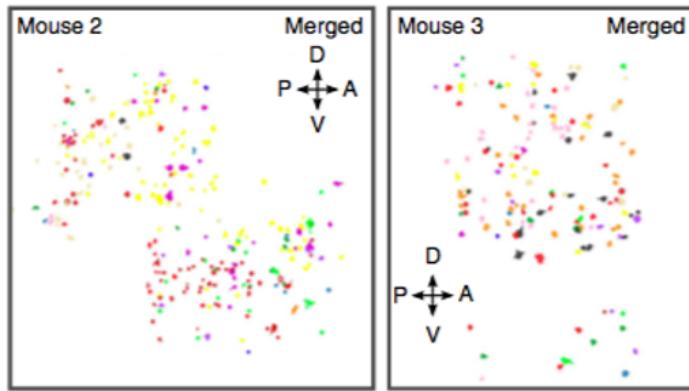
Afin de répondre à cette question, reprenons le groupe de cellules identifié précédemment, que nous avons réparties en 7 clusters. On peut localiser ces 7 clusters au sein de la zone corticale observée.

De la même manière que pour l'organisation spatiale selon la fréquence ou l'intensité préférentielle des neurones, il est ici difficile de distinguer une organisation locale. En effet, les neurones identifiés comme appartenant à un même cluster sont dispersés parmi les autres cellules de la fenêtre d'observation. Pour autant, on peut noter une proximité spatiale entre certains neurones d'un même cluster ou entre des clusters correspondant à des réponses caractéristiques proches.

- On peut noter que pour trois des neurones du groupe G5 (triangle rouge), le plus proche voisin parmi les neurones sélectionnés est un neurone du même cluster. On peut émettre l'hypothèse que les neurones proches de ces neurones, ont des spécificités fonctionnelles semblables, même s'ils n'ont pas été activés lors de nos séries de stimulations.
- De même les deux neurones identifiés du cluster G4 sont deux neurones adjacents (en vert foncé sur l'image).
- Il est aussi intéressant de noter la proximité des neurones des groupes G1, G2, G3, tous localisés dans la même aire centrale entourée sur l'image ci-dessus. On observe ainsi une corrélation entre la proximité spatiale et la similitude dans les réponses caractéristiques de ces groupes de neurones

Des expériences de clustering similaires, menées par l'équipe de Brice Bathellier [4] conduisent à des conclusions relativement semblables. Certaines expériences (expérience 2) attestent d'une proximité spatiale significative entre les neurones appartenant à un même cluster, mais d'autres (expérience 3) donnent des résultats moins significatifs. Néanmoins, en étudiant la fraction de cellules dans un rayon proche appartenant au même cluster, les auteurs ont conclu à une corrélation entre la proximité entre deux neurones et la similitude de leur réponse préférentielle [7] et [11].

Localisation des cellules en fonction de leur cluster d'appartenance



Chapitre 4

Perspectives et regard critique sur les résultats

4.1 Analyse et critique des résultats

Nous avons fait face lors de notre analyse des données aux difficultés inhérentes à l'étude du cerveau. Celles-ci limitent les conclusions précises que nous pouvons tirer.

La première limite tient au faible nombre d'expériences réalisées. Nous avons réalisé trois séries d'enregistrements, sur deux souris différentes, ce qui limite la fiabilité des résultats. Au cours de chaque expérience, afin d'obtenir la caractérisation la plus fiable possible de l'activité des neurones de la zone observée, chaque son est répété 20 fois à l'identique. On observe pour une partie non négligeable des neurones que la réponse à un même son varie significativement d'une répétition à l'autre, de sorte que l'on ne pouvait être en mesure d'étudier ces neurones. Aussi obtenir une caractérisation fiable de l'activité d'un neurone nécessite-t-il un grand nombre de données et d'expériences. La plupart des publications font état d'au moins 15 séries d'enregistrement, et utilisent plus de deux souris différentes, afin d'accroître la fiabilité et la légitimité de leurs conclusions.

De plus, il s'agit d'une étude comportementale. Lors de l'expérience, la souris est soumise à un ensemble de pressions extérieures (elle est attachée par le crâne, enfermée dans une boîte, etc). Même si nos deux souris ont été entraînées au préalable, un grand nombre de facteurs incontrôlables au cours de l'expérience (état d'éveil, attention, émotions) parasitent le comportement des neurones.

Soulignons également que nous observons une aire corticale de $1mm^2$, ce qui ne permet pas d'accéder à une organisation globale de la zone corticale responsable de la perception sonore, et que nous avons accès à une profondeur précise (entre 100 et 200 micromètres) mais non à une éventuelle organisation de la zone observée dans son épaisseur. Un travail de généralisation est donc compliqué.

Plusieurs publications [12] attestent de la difficulté de distinguer une organisation spatiale claire à l'échelle locale dans le cortex auditif des souris. Selon les auteurs, il semblerait que l'organisation neuronale à l'échelle locale soit plutôt hétérogène à l'exception de quelques fortes corrélations entre des neurones voisins, attestant possiblement d'une carte fréquentielle du cortex,

mais plus probablement de connexions aléatoires entre neurones proches. Nos résultats concordent avec une telle absence d'organisation claire à l'échelle locale, mais leur seule exploitation ne suffit pas à la prouver.

4.2 Perspectives, solutions envisagées

Apport de nos expériences

Conscients de la nuance à apporter à l'ensemble de nos résultats, nous pouvons cependant envisager quelques perspectives au regard de notre étude. Nous présentons ici un modèle qui pourrait être retrouvé à l'échelle d'un plus grand nombre de neurones. Il apporte en tout cas des possibilités de discussion, particulièrement dans le cadre de notre problématique.

Initialement nous souhaitions apporter un regard sur l'étude neuronale de la surdité. N'ayant pu disposer de souris de laboratoire sourdes et non sourdes, nous ne pouvons envisager de solutions spécifiques à la surdité. Cependant, il est toujours possible pour nous de nous intéresser à la question des défauts d'auditions. En effet, nous avons, à l'échelle des cellules réactives, distingué des groupes réactifs à certaines gammes d'intensité. En particulier, nous avons repéré deux groupes de cellules potentiellement intéressant :

- Un groupe de neurones réagissant sur la gamme [30dB-80dB]
- Un groupe de neurones spécifiques des basses intensités à 30dB

L'isolation sonore de la souris par rapport au bruit ambiant du microscope a permis d'identifier des caractéristiques neuronales intéressantes à basse intensité (dans la gamme 30-35dB) dont ne faisaient pas mention les études précédentes. On a en effet observé un surnombre de neurones activés dans cette gamme d'intensité, et identifié des neurones spécifiques de cette gamme.

On peut penser que ces groupes ont un rôle central dans l'analyse des sons et particulièrement des sons de basse intensité. Dès lors, on peut émettre l'hypothèse que dans tout réseau neuronal, certains neurones sont consacrés à l'analyse des sons de basse intensité. Il serait alors fort probable que chez des personnes possédant des défauts d'audition, ces neurones soient défectueux (inactifs ou ayant des difficultés à s'entrainer). Réactiver ces neurones serait une solution. De même, la déficience d'un groupe de neurones qui réagit sur l'ensemble du spectre auditif pourrait expliquer une autre forme de problèmes d'audition. Une démarche visant à repérer ces neurones pour les réactiver pourrait aussi être envisagée.

L'optogénétique, une solution ?

Nous avions découvert lors de nos recherches l'usage de l'optogénétique pour stimuler une activité neuronale. L'opto-génétique est une technique utilisée depuis une dizaine d'années pour stimuler l'activité neuronale [13]. Son intérêt majeur est de stimuler spécifiquement un type cellulaire en laissant les cellules voisines intactes. La première étape consiste à faire exprimer par les neurones ciblés des protéines sensibles à la lumière (opsines). On peut ensuite moduler l'activité de ces neurones en appliquant un rayon de lumière dans le cerveau de l'animal.

Notre idée initiale était de cibler des groupes de neurones ayant une fonctionnalité précise

dans le codage neuronal et de les repérer dans l'espace. À partir de la cartographie obtenue précédemment, il est donc possible de restaurer l'activité des neurones dont le fonctionnement était anormal en cas de surdité (faible intensité). Le problème qui reste à résoudre est celui de contrôler spécifiquement les neurones qui expriment la protéine photoactivable, ce qui reste aujourd'hui difficile du fait de la fragilité de la connaissance actuelle du cortex auditif.

A ce titre, nous pensons que l'optogénétique, solution dont nous espérions obtenir des résultats, ne peut pas encore, au vu de l'état de connaissance actuel du cortex auditif, apporter de solutions concrètes aux défauts d'audition.

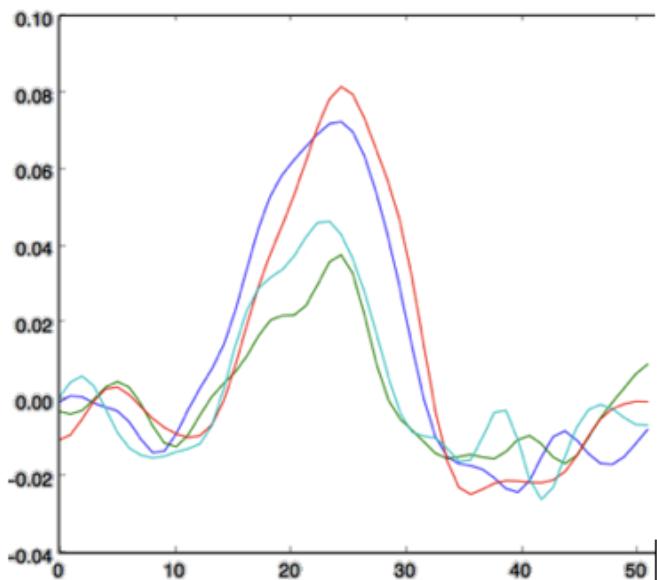
Thérapie génique ?

Identifier des lésions ou dysfonctionnements directement du cortex auditif pouvant expliquer certains cas de surdité est un des enjeux actuels de la recherche en neuroscience sur le cortex sensoriel. L'unité de recherche de 'Génétique et physiologie de l'audition', menée par des chercheurs de l'Institut Pasteur, de l'Inserm et de l'UPMC, a par exemple récemment identifié chez la souris trois gènes dont l'altération provoque des atteintes du cortex auditif. Ces résultats prouvent que la défection auditive des patients sourds ne résulte pas toujours uniquement d'une altération de la cochlée ou du nerf auditif mais aussi d'une atteinte directe du cortex auditif. L'équipe de l'Inserm a alors exploré la voie d'une thérapie génique pour traiter les souris atteintes de surdité génétique, en ciblant les gènes préalablement identifiés.

En exploitant les progrès de la thérapie génique, et des systèmes tels que CRISPR, on pourrait imaginer cibler les gènes responsables du fonctionnement des neurones qui nous intéressent (ceux que nous avons identifiés comme responsable de la perception des basses intensités, ou ceux que nous avons caractérisé de centraux dans la perception de tous les stimuli sonores). En supposant qu'un fonctionnement altéré de ces neurones soit à l'origine de défauts d'audition chez des patients sourds ou malentendants, on pourrait grâce aux techniques actuelles imaginer rétablir la fonctionnalité de ces neurones par mutation génétique [14].

Annexe A : Matrice de corrélation et coefficient de Pearson

Tout au long de notre analyse, nous présentons des matrices de corrélation avec pour coefficient de corrélation utilisé le coefficient de Bravais-Pearson. La question sous-jacente que nous nous sommes posée est la quantification de la similitude entre plusieurs signaux temporels. Par exemple, nous voulions disposer d'une valeur qui considère que ces 4 courbes caractérisent des réponses physiologiques analogues :



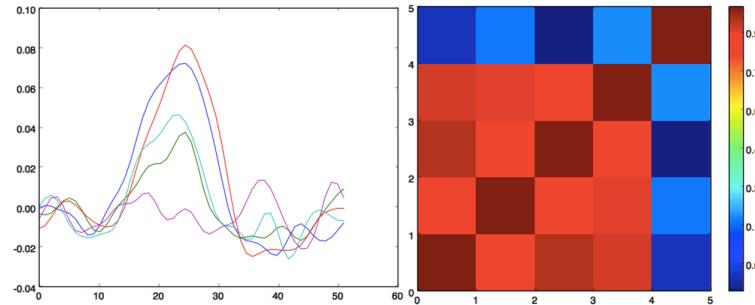
En effet, la valeur absolue du signal nous intéresse moins que l'allure de la réponse et sa localisation dans le temps. Il nous fallait donc disposer d'un coefficient de corrélation de type centré-réduit qui mette en évidence la linéarité entre les courbes. Ainsi le coefficient de corrélation de Bravais-Pearson nous a semblé être le plus intéressant. Pour deux échantillons $x = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ et $y = (y_1, y_2, \dots, y_n)$, et il est défini comme suit :

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Dans la pratique, il est égal à 1 dans le cas où l'une des variables est une fonction affine

croissante de l'autre variable. Les valeurs intermédiaires renseignent sur le degré de corrélation affine entre les deux échantillons. Il s'adapte donc à notre problème.

Testons le résultat obtenu du coefficient de Pearson sur les signaux précédents. Nous y ajoutons un signal a priori peu corrélé pour tester la fiabilité de ce coefficient de corrélation.



Nous voyons, que ce coefficient indique une forte corrélation entre les 4 courbes qui nous semblent analogues et une faible corrélation avec la 5ème (rose), ce qui est le résultat attendu. A ce titre, le coefficient de Pearson nous est apparu comme le plus fiable pour quantifier la similitude dans notre problème.

Annexe B : Le regroupement ascendant hiérarchique appliqué à notre problème de regroupement des neurones par clusters d'activité

Pour réaliser notre regroupement, nous nous plaçons à son fixé, et regroupons les neurones par rapport à leur activité moyennée sur l'ensemble de répétitions au son considéré. Nous sommes face au problème suivant : nous disposons d'un échantillon $X = (X_1, X_2, \dots, X_n)$ de n cellules où les données X_i correspondent à la réaction d'une cellule, c'est-à-dire un vecteur $X_i = (x_{t1}, x_{t2}, \dots, x_{t51})$ matérialisant sa réaction moyenne dans le temps.

Réalisation du dendrogramme

Le regroupement hiérarchique consiste à construire une structure d'arbre binaire de fusion en partant des feuilles qui représentent les éléments de X et en remontant jusqu'à la racine en fusionnant deux-à-deux les sous-ensembles les plus proches définis en fonction d'une distance appropriée : $\Delta(X_i, X_j)$. L'arbre binaire en question, appelé dendrogramme, est l'arbre que nous représentons dans nos figures.

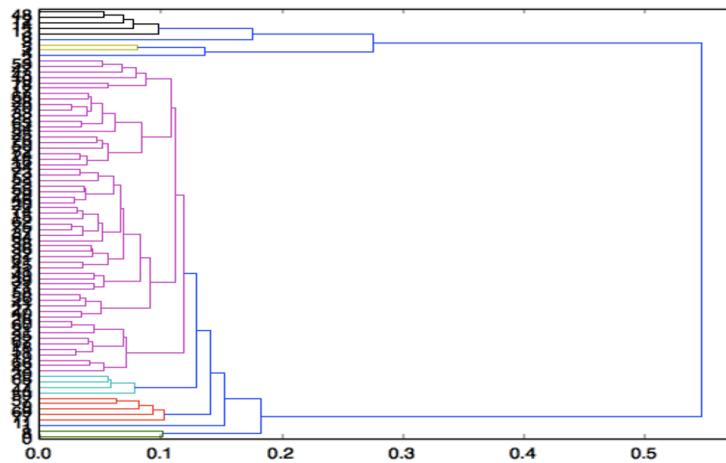
Le principe algorithmique appliqué pour notre expérience se résume ainsi :

- Initialisation des données par création d'une liste de cluster singleton : $C_i = X_i$
- Tant qu'il reste au moins deux clusters dans la liste :
 - Sélectionner C_i et C_j qui minimisent $\Delta(X_i, X_j)$
 - Regrouper les deux clusters : $C_{i,j} = C_i \cap C_j$; ajouter $\Delta(X_i, X_j)$ à la liste ; retirer C_i et C_j de la liste
- Retourner le groupe final de la liste

Dans le paramétrage de notre algorithme, il nous faut déterminer une mesure de regroupement $\Delta(\cdot, \cdot)$ adéquate. Par lecture des articles [15] et [16], il nous a semblé que la mesure de Ward était la plus appropriée :

$$\Delta(C_i, C_j) = \frac{n_i n_j}{n_i + n_j} \|centre(C_i) - centre(C_j)\|^2$$

où n_i est le cardinal du groupe C_i et les centres sont calculés comme étant les barycentres des groupes par rapport à la norme euclidienne.



Répartition en cluster

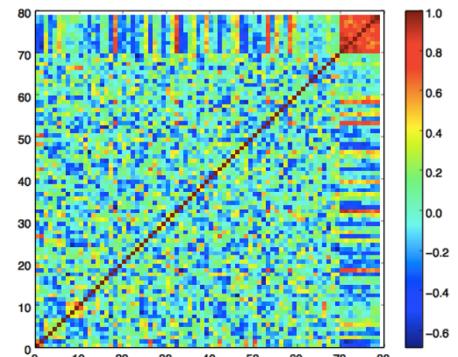
La deuxième étape consiste à partitionner le dendrogramme pour regrouper nos neurones. La lecture de différents cours et articles ne nous a pas permis de déterminer une démarche optimale dans l'établissement du seuil nous permettant de faire la coupe du dendrogramme en plusieurs groupes de neurones. Nous avons donc déterminé ce seuil empiriquement pour réaliser la coupe qui nous a semblé la plus adéquate. Cette étape nous a semblé être une faiblesse de notre regroupement. Cependant, en affichant nos résultats comme nous allons le faire par la suite, il nous sera toujours possible de corriger nos erreurs à la main.

Représentation du regroupement avec la matrice de corrélation. Corrections appor-tées

Une fois le partitionnement réalisé sur le dendrogramme, nous associons à chaque neurone le cluster auquel il appartient (cf. les couleurs sur le dendrogramme). A partir de ces informations, nous réorganisons notre jeu de données en permutant les indices de sorte à ce que les données soient ordonnées par cluster $X = (X_{C1}, X_{C1}, \dots, X_{C2}, X_{C2}, \dots)$.

Ainsi, on souhaite voir apparaître des « carrés » de forte corrélation (en effet, les neurones appartenant à un même cluster sont regroupés par leur similitude de réactivité). C'est bien ce que l'on observe sur les matrices de corrélation post-regroupement. Cela suggère que le regroupement s'est fait correctement.

Cependant, il demeure des petites erreurs et qu'on constate que des neurones qui corrèlent bien au « carré » de forte corrélation ne sont pas inclus dans le cluster. Cependant, ces cellules sont facilement repérables (« barrettes » rouges) et nous pouvons à la main établir une correction finale.



Chapitre 5

Bibliographie

- [1] Lin Tian, Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators, *Nat Methods.* 2009 Dec ; 6(12) : 875–88
- [2] Nelken, I. Processing of complex sounds in the auditory system. *Curr Opin Neurobiol.* 2008.
- [3] Nelken, I, Bizley J, Shamma SA, Wang X. Auditory cortical processing in real-world listening : the auditory system going real. 2014
- [4] Thomas Deneux, Alexandre Kempf, Aurélie Daret, Emmanuel Ponsot and Brice Bathellier. Temporal asymmetries in auditory coding and perception reflect multi-layered nonlinearities. *Nature Communications.*2016.
- [5] Svoboda, K. and Yasuda, R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* 50, 823–839 (2006).
- [6] Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K. and Konnerth, A. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 7319–7324 (2003).
- [7]Bathellier, B., Ushakova, L. and Rumpel, S. Discrete neocortical dynamics predict behavioral categorization of sounds. *Neuron* 76, 435–449 (2012).
- [8]Goldstein, M.H. Jr. and Abeles, M. Note on tonotopic organization of primary auditory cortex in the cat. *Brain Res.* 100, 188–191 (1975).
- [9] Goldstein, M.H. Jr., Abeles, M., Daly, R.L. and McIntosh, J. Functional architecture in cat primary auditory cortex : tonotopic organization. *J. Neurophysiol.* 33, 188–197 (1970).
- [10] Bandyopadhyay, S., Shamma, S.A., and Kanold, P.O. (2010). Dichotomy of functional organization in the mouse auditory cortex. *Nat. Neurosci.* 13, 361–368.
- [11] Mountcastle, V.B. The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120, 701–722 (1997)
- [12] Gideon Rothschild, Israel Nelken, and Adi Mizrahi. Functional organization and population dynamics in the mouse primary auditory cortex. *Neurons.* 2009

[13] Dominique Förster, Marco Dal Maschio, Eva Laurell and Herwig Baier. An optogenetic toolbox for unbiased discovery of functionally connected cells in neural circuits. *Nature Communications* volume 8, Article number : 116 (2017)

[14] Alice Emptoz, Vincent Michel, Andrea Lelli and Saaid Safieddine, Local gene therapy durably restores vestibular function in a mouse model of Usher syndrome type 1G, *PNAS*, 5 septembre 2017

[15] Fionn Murtagh. A survey of recent advances in hierarchical clustering algorithms. *The computer Journal*, 26(4), 1983

[16] Fionn Murtagh and Pierre Legendre. Ward's hierarchical agglomerative clustering method : Which algorithms implemet Ward's criterion ? *J.Classification*, 31(3), 2014