HAL
open science

La perception des mouvements d'air par le système cercal chez le grillon des bois Nemobius sylvestris

Fabienne Dupuy

To cite this version:

Fabienne Dupuy. La perception des mouvements d'air par le système cercal chez le grillon des bois Nemobius sylvestris. Ecologie, Environnement. Université François Rabelais - Tours, 2009. Français. NNT : . tel-00441635

HAL Id: tel-00441635

https://theses.hal.science/tel-00441635v1

Submitted on 16 Dec 2009

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

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

UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SANTE, SCIENCES, TECHNOLOGIES

INSTITUT DE RECHERCHE SUR LA BIOLOGIE DE L'INSECTE

THÈSE présentée par :

Fabienne Dupuy

soutenue le : **23 Octobre 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**
Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

La perception des mouvements d'air par le système cercal chez le grillon des bois *Nemobius sylvestris*

THÈSE dirigée par :

M. LAZZARI Claudio	Professeur, Université François - Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Mme ANTON Sylvia	Directeur de recherche, INRA Versailles, Versailles
M. MILLER John	Professeur, Montana State University, Bozeman, USA

JURY :

Mme ANTON Sylvia	Directeur de recherche, INRA Versailles, Versailles
M. BERNSTEIN Carlos	Directeur de recherche, CNRS, Lyon
M. CASAS Jérôme	Professeur, Université François - Rabelais, Tours
M. LAZZARI Claudio	Professeur, Université François - Rabelais, Tours
M. MILLER John	Professeur, Montana State University, Bozeman, USA

A mon père

REMERCIEMENTS

Je remercie Claudio Lazzari et Jérôme Casas pour m'avoir accueillie dans leur équipe respective, pour m'avoir encadrée et avoir été présent tout au long de ma thèse. J'ai énormément appris à vos côtés chacun m'ayant beaucoup apporté dans des domaines différents.

Merci Claudio pour toutes les conversations enrichissantes que nous avons eu et pour le rapport amical que nous avons. J'ai beaucoup apprécié de pouvoir me confier sur mes incertitudes, mes craintes…

Merci Jérôme pour les conversations que nous avons eu et tous les conseils que vous m'avez donné. Merci de m'avoir permise de participer à autant de congrès et de faire le stage dans le laboratoire de John Miller. Je suis tout à fait consciente du privilège que j'ai eu durant ma thèse.

Je remercie les deux directeurs successifs de l'IRBI (Jérôme Casas et Jean-Paul Monge) pour m'avoir accueillie dans leur Institut.

Je tiens à remercier John Miller et Sylvia Anton d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et Carlos Bernstein d'avoir accepté d'être le président du jury.

Je remercie Sylvia Anton qui m'a accueillie dans son laboratoire, a pris de son temps et celui de son équipe pour me former sur les enregistrements intracellulaires.

I'd like to thank John Miller for having allowed me to work in his lab. Thank you also for all the time you spent explaining me electrophysiological techniques and also for all the fruitful conversations. Thank you Sally for having warmly welcomed me, it was a big pleasure to meet you. To Graham Cummins, thank you for having helped me in electrophysiological data analysis and for all the time and the patience you spent explaining me mathematics. Thanks to all the people of John's team for their welcome.

Gracias Tere para todo lo que me enseñaste sobre los insectos, aprendí un montón con vos. Además me gusto mucho poder confiarte todas las preguntas y las dudas que tuve.

Je remercie Arnold pour m'avoir initiée à Blender et R, pour m'avoir aidée lors de mes premiers pas dans la programmation et pour m'avoir guidée dans les méandres des statistiques.

Je remercie Thomas pour m'avoir aidée à comprendre les mécanismes physiques et aérodynamiques qu'il m'a fallu aborder tout au long de ma thèse. Ce fut un véritable plaisir de travailler et de voyager avec toi à travers l'Europe pour participer aux congrès.

Je remercie Christelle pour son aide en mathématique et statistiques.

Je remercie Jean-Philippe Christidès et Dominique Pierre pour leur participation aux expériences sur le terrain. Jean-Philippe merci également de m'avoir aidée avec le piston et les caméras.

Je remercie Anne-Geneviève Bagnères pour m'avoir donnée accès au matériel d'imagerie calcique.

Merci aux stagiaires, Jean-Baptiste, Marie-Anne et tout particulièrement Mélanie avec qui se fut un vrai plaisir de travailler.

Je remercie Clément, Sylvain, David, Marlène et Nathan pour avoir pris le temps de corriger mon anglais.

Merci aux secrétaires Christine, Dominique, Sonia et Hélène pour m'avoir facilité les démarches administratives.

Je remercie les personnes avec qui j'ai partagé les bureaux, Sylvain, Arnold, Sylvie, Aurélie, Hélène, Clément, Marion, Sébastien. J'ai pu travailler dans une très bonne ambiance grâce à vous.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidée à ramasser les grillons (la liste est longue et surement non exhaustive) Fabrice, Carole, Sylvain A, Sylvain P, Hélène, Marie Romina, Vincent, Guirec, Jérémie, Wilfried, Jonathan, Batiste, Marion, Mélanie, Teresita, Marie-Anne, Aurélie.

Un grand merci à tout le personnel de l'IRBI pour la bonne ambiance, la gentillesse et les conversations enrichissantes que j'ai pu avoir avec certains.

Je remercie toute ma famille pour son soutien. Merci a ma maire e mon fraire enta lor sostent dins totas aqueras anadas d'estudis, medish si comprenon pas trop enta que servish. Pensi a mon pair, que es pas aquio enta partajar aquet moment.

Guirec merci pour ta patience, ton écoute et ton soutien qui m'ont aidée chaque jour à travailler.

Merci à tous mes amis pour leur soutien. Gracias sobre todo a Romina y Sebastián, me ayudaron un montón a mi llegada, y además fue un gran placer hacer deporte, salidas y guitarra con ustedes, gracias para su amabilidad.

Je remercie vivement Joachim Mogdans et les autres membres du consortium CILIA pour les discussions enrichissantes que nous avons eu dans les différents colloques.

Je remercie tous les grillons qui ont participé aux expériences et je m'excuse auprès de la population de grillons du bois des hâtes qui a vu ses membres disparaître au cours de ces 4 années.

RESUME

Les orthoptères possèdent à l'arrière de leur corps deux organes appelés « cerques », recouverts de poils mécanosensoriels qui leur permettent de percevoir des courants d'air, en particulier ceux générés par l'attaque de prédateurs. Le système sensoriel cercal comprenant notamment des poils filiformes (récepteurs de vent) et le système nerveux traitant les informations perçues, à fait l'objet de nombreuses études depuis près d'un demi siècle. Toutefois, ces études n'ont que rarement pris en compte les conditions naturelles dans lesquelles le système fonctionne. Nous nous sommes donc attachés à mieux comprendre comment le système cercal permet aux insectes qui le possèdent, de détecter l'attaque des prédateurs dans leur milieu naturel. Pour cela, nous avons étudié le grillon des bois *Nemobius sylvestris,* dont l'habitat naturel, la litière des bois, est facilement accessible, permettant des études sur le terrain. Dans notre étude, nous avons utilisé des techniques d'analyse quantitative du comportement, d'électrophysiologie et d'optophysiologie. Afin de stimuler de manière appropriée, nous avons utilisé un piston mimant l'attaque d'un prédateur naturel (l'araignée loup). Nous avons tout d'abord, grâce à des études comportementales, analysé les capacités de détection et de fuite des grillons. Nous avons observé que les cerques jouent un rôle prédominant dans la détection de l'attaque. Néanmoins, d'autres organes seraient impliqués. La détection de l'approche du piston n'a pas toujours abouti à une fuite efficace (c'est à dire sans contact avec le piston). Il a également été observé que l'efficacité de la fuite varie en fonction de la direction d'approche du piston. Des enregistrements extracellulaires ont été réalisés sur la chaîne nerveuse ventrale de grillons libres en milieu naturel ainsi qu'en laboratoire. L'analyse des données nous a permis d'observer que le système sensoriel cercal perçoit le bruit de fond qui semble générer une modulation de l'activité nerveuse en réponse à l'approche du piston. Les interneurones ascendants enregistrés répondaient de manière maximale pour un courant d'air autour du cerque de 8 mm/s. Nous avons mis en place un système d'enregistrement optophysiologiquede l'activité calcique dans les neurones du système nerveux central des grillons et un logiciel a été développé permettant l'analyse de ces données. Les résultats de notre étude sont discutés dans une perspective écologique d'interaction avec le milieu et dans le contexte d'une réelle attaque par un prédateur.

Mots clés : *Nemobius sylvestris*, comportement de fuite, perception, milieu naturel, système sensoriel cercal, enregistrements électrophysiologiques.

ABSTRACT

Orthopthera insects possess at the rear of their body two antennae-like appendages named the "cerci", covered by mechanosensory hairs, allowing insects to perceive air currents, in particular those generated by predator attacks. The cercal sensory system, which includes filiform hairs (wind detectors) and the nervous system that processes the perceived information, has been the subject of many studies since half of a century. Nevertheless, these studies rarely took into account the natural conditions under which the system actually works. The aim of this work was to better understand how the cercal sensory system allows insects to detect predator attacks in their natural environment. We chose as model system the wood cricket *Nemobius sylvestris*, whose natural habitat, the forest litter, is easily accessible for field studies. In our study, we have employed quantitative behavioural methods, electrophysiology and optophysiology. To appropriately stimulate the cricket, i.e. mimicking the attack of a natural predator (e.g. wolf spider), we employed a piston. We have observed that cerci play a major role in the attack detection. Nevertheless, other organs seem also be involved. The detection of the approaching piston is not sufficient to evoke an efficient escape (i.e. without any contact with the piston). The escape success varied according to the approaching direction. Extracellular recordings from the ventral nervous cord were conducted on freely moving crickets in the natural environment and in the laboratory. These recordings revealed that the cercal sensory system perceives the background noise and that its presence generates a modulation of the neural activity in response to an approaching object. Ascendant interneurones showed maximal neural responses for an air current of 8 mm/s. We have developed a preparation for recording calcium activity from the cricket central nervous system and a software was developed to process optophysiological data. The results of our study are discussed in an ecological perspective of interaction with the environment and in the context of a true predator attack.

Keywords: *Nemobius sylvestris*, escape behaviour, perception, natural environment, cercal sensory system, electrophysiological recordings.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 3
RESUME 5
ABSTRACT 6
TABLE DES MATIERES 7
LISTE DES TABLEAUX 9
LISTE DES FIGURES 10
LISTE DES ANNEXES 18

INTRODUCTION GENERALE 19
Systèmes sensoriels : détection des prédateurs 20
La détection du prédateur et la fuite 21
Problématique : bruit de fond et considérations écologiques 33
Objectif 35

PREMIERE PARTIE *Nemobius sylvestris*, le modèle d'étude 36
Biologie de *Nemobius sylvestris* 37
Prédateurs 41
Système cercal et comportement de fuite 41

DEUXIEME PARTIE Détection d'un objet en approche par le grillon des bois : bases sensorielles et comportement de fuite 44
Detection of approaching objects by wood crickets: sensory basis and escape behaviour 45
Abstract 46
Introduction 47
Methods 48
Results 52
Discussion 60

TROISIEME PARTIE Perception mécanosensorielle en milieu bruité 65
Mechanosensorial perception in noisy environments 66
Introduction 67

Material and methods 68
Results 74
Discussion 81

QUATRIEME PARTIE Etude du codage spatial des informations mécanosensorielles au niveau du ganglion abdominal terminal 85
OpenFluo: A free open-source software for optophysiological data analyses 86
Abstract 87
Introduction 88
Materials and methods 89
Results 98
Discussion 99
Etude optophysiologique de l'activité calcique du ganglion abdominal terminal du grillon *Nemobius sylvestris* 101
Introduction 102
Matériel et méthodes 104
Résultats 107
Discussion 113

DISCUSSION GENERALE 117
De l'écologie au système nerveux 120
Le rôle des cerques 124
Comportement inné et plasticité 125
Les conditions expérimentales 127
Perspectives 127
Conclusion 130

BIBLIOGRAPHIE 131
ANNEXES 143
Annexe 1 Caractéristiques du piston 144

LISTE DES TABLEAUX

Table 1 : Results of the statistical analysis (binomial tests) for comparisons between directions of stimulation (according to cricket). As multiple comparisons were done, Bonferoni correction was applied and differences were considered as significant for a P<0.016 (α/3) and NS corresponds to P>0.016 (α/3). 54

Table 2 : Results of the statistical analysis (binomial tests) for comparisons between cricket instars. As multiple comparisons were done, Bonferoni correction was applied and differences were considered as significant for a P<0.016 (α/3). 54

Table 3 : Escape behaviour of the three groups of different developmental levels for the different directions of stimulation. The escape is often constituted of a succession of different actions. Columns refer to the turn action and rows to the escape action. Percentages of crickets performing the action were indicated in the corresponding box. ..55

Table 4 : Results of the statistical analysis (binomial tests) for comparisons between different groups of crickets. As multiple comparisons were done, Bonferoni correction was applied and difference were considered as significant for a P<0.0125 (α/4). 58

Table 5 : Results of the statistical analysis (binomial tests) for comparisons between differents groups of crickets. 60

Table 6 : Experimental results and conditions of 3 different studies. 62

Table 7 : Tableau récapitulatif des réponses calciques obtenues chez les six grillons soumis aux différents traitements (les 3 directions de stimulation 0, 90, et 270° ainsi que le contrôle, sans courant d'air). Dans la première colonne sont indiqués le nom des grillons ainsi que le groupe auquel ils appartiennent. G1: grillons intacts, G2: sans information visuelle, G3: sans informations des centres supérieurs et G4: sans information visuelle ni information des centres supérieurs. Les enregistrements pour lesquels des signaux calciques ont été identifiés sont indiqués par une croix. 111

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Le cerque du grillon des bois (SEM). b, sensille du type bristle ; c, sensille campaniforme ; cl, sensille clavate ; f, sensille filiforme. Barre d'échelle : 200µm. Les cadres montrent les détails d'une sensille filiforme et d'une sensille campaniforme (flèche) (en haut à gauche), d'une sensille bristle (en bas à gauche) et d'une sensille clavate (en bas à droite). 24

Figure 2: Représentation schématique de la base d'un poil filiforme cercal de *Gryllus* et le mécanisme de transmission du stimulus. Le cercle en pointillé est dessiné autour du plus haut point de rotation possible (P.P.A.) et le cercle en trait plein autour du plus bas (P.P.B.). La flèche blanche pointe dans la direction du déplacement de l'axe du poil dont la compression résultante du corps tubulaire par le piquet cuticulaire est la plus efficace. Le piquet cuticulaire se trouve à la pointe de la flèche blanche. Capsule fibreuse (fC) ; coussin fibreux (fCu) ; côté de la dépolarisation (De) ; intérieur (iD) et extérieur (oD) du segment dendritique ; gaine dendritique (DS) ; axe du poil (HS) ; articulation du poil (HA) ; membrane de l'articulation (JM) ; montant cuticulaire (St) ; cellule thecogène (T) ; corps tubulaire (CT) ; direction préférée du poil (flèches) ; épaississement proximal de la gaine dendritique ( ); nervure cuticulaire de la gaine dendritique ( ) ; Canal ecdysial (EC) ; plancher de la chaussette (SF); espace interne récepteur-lymphe (iRL) ; Cadre : vue plus précise de la chaussette du poil (S) et d'un dendrite d'un poil filiforme cercal. D'après Gnatzy et Tautz (1980).....26

Figure 3 : Localisation des quatre types de poils sur le cerque. (A) Cerque dorsal. Les poils T latéraux sont retrouvés sur une petite région proximale qui s'étend distalement comme une étroite bande en position médiane par rapport à la ligne médiane dorsale. Le reste répondant mieux à un vent en direction médiane. Les flèches représentent la sensibilité directionnelle des poils de la région. (B) Cerque ventral. La plupart des poils T ventraux sont sensibles à un vent latéral, bien que quelques uns à la pointe distale sont sensibles à un vent médian. (C) Cerque latéral extérieur. Une bande étroite de poils L postérieurs est bordée par deux bandes de poils L antérieurs. (D) Cerque latéral intérieur. La plupart des poils L médians sont sensibles à un vent postérieur à part une bande plus petite et plus dorsale qui est sensible à un vent antérieur. De Gnatzy et Tautz (1980). (E à J) Représentation schématique de la relation spatiale entre le piquet cuticulaire et le corps tubulaire induisant la réponse directionnelle. Le piquet cuticulaire doit induire une

pression sur le corps tubulaire pour induire une activation nerveuse. Lorsque le piquet cuticulaire se trouve à droite, une inclinaison vers la droite induit une activation des neurones (F). Lorsque le piquet cuticulaire se trouve à gauche c'est une inclinaison vers la gauche qui induit une activation des neurones (J). 27

Figure 4 : Schéma du système cerque-interneurones géants. Le dessin de gauche montre la vue d'un grillon ouvert avec le système nerveux central exposé. Le dessin de droite est la vue du TAG coupé, montrant les projections de deux neurones afférents (sensoriels) (en vert) ainsi qu'un GIN, MGI (en rouge). Il est à noter que l'afférent postérieur L est en contact avec le MGI mais pas l'afférent antérieur L. Modifié d'après Bacon et Murphey (1984). 29

Figure 5: Prédiction anatomique des connections synaptiques entre les neurones afférents sensoriels filiformes et les interneurones. (A) Reconstruction de l'interneurone droit (R) 10-2 représenté en jaune. Arbre afférent de 12 poils filiformes différents représentés en couleurs. La couleur de chaque afférent correspond à la direction du pic d'activation. Ces 12 classes couvrent la gamme de toutes les classes de sensibilité directionnelle des récepteurs. Le dessin dans le cadre montre le code de couleurs qui indique la direction préférée du stimulus par rapport au corps du grillon. (B) Direction préférée des différents interneurones géants. (C) Image de la carte afférente de la direction du courant d'air, pour les deux cerques à la fois, avec une image sur la carte du modèle de compartimentation de l'interneurone 10-2. Chaque classe de direction des arborisations afférentes sont transformées en un « nuage statistique » correspondant à la densité des terminaisons synaptiques pour cette direction du stimulus. Ceci apporte une démonstration directe de la carte neurale de la direction. La superposition entre les interneurones sensoriels avec la carte de la direction des courants d'air des afférents prédit les connections synaptiques des afférents sur ces interneurones. Ici les dendrites des interneurones sont masquées par la couleur correspondante au nuage statistique des synapses afférentes de cette région. (D) Image de la distribution des boutons synaptiques de la population des afférents sensoriels du neurone gauche, dont les couleurs représentent différentes directions du courant d'air du cerque gauche. Vue sagittale. Les varicositées forment une structure continue tridimensionnelle dans le neuropile. Il est à noter que le pic directionnel des varicositées change continuellement avec la localisation le long de la structure. En partant du haut de la structure (rose) et en se déplaçant suivant le sens des aiguilles d'une montre [rouge, jaune (à l'extérieur de la vue), vert et bleu]. D'après Jacobs et al. (2008). 31

Figure 6: L'importance du cadre écologique dans la compréhension du système de fuite du grillon. (1) L'identité des prédateurs affecte la nature du stimulus perçu par le grillon. (2) L'importance relative d'un stimulus peut être fortement affectée par la qualité de sa transmission dans l'environnement local. La perception du signal a été rattachée au type d'habitat chez les chauves souris et les poissons, cela n'a pas été documenté chez le grillon. Le bruit de fond peut également perturber la capacité des grillons à extraire les informations des stimuli. (3) Les tactiques de chasse des prédateurs du grillon peuvent être influencées par l'environnement comme cela a été montré pour d'autres prédateurs. (4) Le comportement et la survie des grillons varient en fonction de l'identité des prédateurs et de leurs tactiques d'attaques. En retour le comportement des grillons peut influencer les tactiques des prédateurs. (5) La morphologie des cerques du grillon est variable parmi les populations de différents environnements (Dangles et al., 2005). (6) Ceci suggère fortement une influence des prédateurs et/ou des caractéristiques de l'environnement sur la morphologie des cerques et une capacité de ceux-ci à répondre à des pressions de sélection. D'après Dangles et al., (2006a). 34

Figure 7 : Photo d'une larve de *Nemobius sylvestris* et de son prédateur principal l'araignée loup *Pardosa sp.* 37

Figure 8 : (A) Histogramme représentant les mesures de la longueur des fémurs postérieurs de *N. sylvestris* au cours de la croissance larvaire. En abscisses les tailles en unités micrométriques (en noir) et en mm (en rouge). En ordonnée les effectifs. (B) Cycle biologique de *N. sylvestris* dans la région toulousaine. Chaque histogramme mensuel figure les proportions relatives des différents stades larvaires présents dans les récoltes faites dans la nature. D'après Campan (1965). 40

Figure 9 : (A) Section transversale d'un connectif de la chaine nerveuse ventrale, proche du TAG. LM. (B) Schéma du TAG et de la position des GINs reconstruit à partir de marquages au cobalt et de sections en série dans les trois plans de préparations à l'ethylgallate. Les GINs de *N. sylvestris* ont été nommés en suivant la nomenclature proposée par Jacobs et Murphey (1987), en leur attribuant le neuromère correspondant du 7ème au 10ème segment abdominal. D'après Insausti et al. (2008). 43

Figure 10 : Set-up used to study escape behaviour. A cricket was placed at the centre of the arena delimited by a cylinder (B). The base of the arena was a rotating area (A) allowing to orientate the cricket according to the position of the piston (E). When the cricket was motionless, the tube (C) was removed gently thanks to an articulated arm (D). Using the

articulated arm allowed to avoid generating air movement. If the cricket stayed immobile after the removing of the tube, the piston was activated and the cricket behaviour was recorded thanks to the high speed video camera (F). 49

Figure 11 : (A) Stimulation angles. According to the position of the cricket, it was stimulated at 0° (from the front), 270° (from the side) and 180° (from behind). (B) Escape angles correspond to the angle formed by the initial position of the cricket (at the beginning of the experience) (grey cricket) as related to the piston longitudinal axis and the position of the cricket after escaping (black cricket). 50

Figure 12 : Responses rates for the three groups of different developmental level J1 (1st to 3rd instars; N=65) J2 (7th to 9th instars; N=61) and A (adults; N=62) and the three directions of stimulation 0° (in black), 90° (in grey) and 180° (in white). Rates of two responses are represented, the detection of the stimulation (dashed lines) and the successful escape (full bars). 53

Figure 13 : Distribution of escape angles of J1 crickets. Black arrows represent the stimulation direction which is 0° since angles were measured according to the longitudinal axis of the piston. External circle correspond to N=10. (A) Results for a stimulation from the side. (B) Results for a stimulation from behind. 56

Figure 14 : Responses rates for the two directions of stimulation 0 and 180° and for intact crickets (black bars), ablated cerci crickets (grey bars) and ablated antennae crickets (white bars). Rates of detection of the stimulation (dashed lines) and of the successful escape (full bars) are represented. 58

Figure 15 : Responses rates for two directions of stimulation 0 and 180°, for intact crickets (black bars), covered eyes crickets (white bars) and crickets with visual information condition (white bars). Rates of two responses are represented, the detection of the stimulation (dashed lines) and the successful escape (full bars). 59

Figure 16 : Distribution of escape angles of J1 crickets in presence of visual information (e.i. black square) in the visual field of the cricket. External circle correspond to N=8. 60

Figure 17 : Diagram of the set-up for behavioural and electrophysiological experiments. Dotted blue lines represent the triggering signal. In the laboratory, electrophysiological recordings were done on restrained crickets and the piston was used without the extension (1). In field recordings, the insects remained free and the piston extension allowed the correct positioning of the piston (2). Left insert shows the delay measured in electrophysiological data. The blue line corresponds to trigger values. The green curve

corresponds to the electrophysiological recording. Right insert is diagram representation of delays measured in the video recordings between the video trigger and the movement of the piston without and with the extension. 69

Figure 18: Insect preparation: (A) two electrodes are placed in the insect body, one of reference (Er) and the other for recording (Ee). Electrodes were fixed with dental wax at several points of the body, represented by dotted red circles. (B) The hook-shaped Ee electrode was placed and bent around one connective just before the TAG. (C) Both electrodes were fixed with the dental wax to the dorsal side of the thorax and the abdomen, allowing the cricket to move freely. 71

Figure 19 : (A) The graphic represents the activity recorded extracellularly at the level of one of the connectives between the last and the fore last ganglion. Many spikes can be observed with an important variation of the amplitude, which was used to distinguish the active units. (B) Low recording rate give approximate minimum value of potential of spikes as shown by the blue curve. Interpolation was used to calculate the true minimum value indicated by the red arrow. (C) Distribution of spikes' minimum values of potential for one recording, represented in blue, shows groups of data. Red curves represent clusters found by cluster analysis using the Mixmod software. (D) Clusters of all recordings were matched one another applying scale modifications and translations. (E) Several clusters were observed allowing us to distinguish 6 units. Dotted lines represent the 6 thresholds used to analyse all recordings. 73

Figure 20 : Examples of electrophysiological recordings after filtering. (A) Recording under laboratory conditions (low background noise). An increase in the neural activity is clearly observed during the piston movement toward the cricket, indicated by the upward deflection of the red line. This movement was a unidirectional thrust of the piston (B) Field recording under natural (high background noise) conditions. The increase in the neural activity is clearly observed during the piston movement. 75

Figure 21 : Mean response frequency ± SEM during the sensory stimulation in function of piston velocity in the laboratory (solid line) and in the field (dashed line). (A) Unit 4. (B) Unit 5. (C) Unit 6. 76

Figure 22 : Mean response rate ± SEM 6 different units identified during the control (no piston movement) in the laboratory (in black) and in the field (in white). 77

Figure 23 : The density of spikes for unit 4 (in blue), unit 5 (in red) and unit 6 (in black) during time. (A) Piston velocity of 15 cm/s. One example of time at maximal spike density

(TMSD) is represented for unit 5. (B) Piston velocity of 25 cm/s. (C) Piston velocity of 50 cm/s. The piston movement is represented by the yellow area. 79

Figure 24 : Observed TMSD as a function of the expected TMSD for piston velocities of 15 cm/s (in blue), 25 cm/s (in red) and 50 cm/s (in black). The red dotted line represents equal values. 80

Figure 25 : Software interfaces: (A) *QuickFluo*, interface, for rapid processing of individual recordings during experiments. (B) *FullFluo*, for simultaneous processing of series of recordings, from one or several experiments. 91

Figure 26 : Schematic diagram of the various steps in data processing. f_{abi}, fluorescence of a given area for the background image; f_{pbi}, fluorescence of a given pixel for the background image; f_{asi}, fluorescence of a given area for the signal image; f_{psi}, fluorescence of a given pixel for the signal image; F, mean of several f values, indices of F follow the same code as for f; w1 corresponds to wavelength 1 and w2 to wavelength 2. 92

Figure 27 : Processing of the data for a single biological recording for honeybee antennal lobe. (A) Raw data. (B) Spatially smoothed data. (C) Spatially and temporally filtered image. .94

Figure 28 : Analysis of an artificial recording. The recording has a noisy background, with random values around a mean of 1700 and a standard deviation of 20 over 40 frames. The activation area presents random values with a mean of 1720 and standard deviation of 20 (large black square) from the 20th to the 22nd frame (gray area). Sample frequency: 5 fps. The small black square indicates the area used for time-course analysis. 97

Figure 29 : Analysis of a biological recording from the antennal lobe of the honeybee *Apis mellifera* incubated in Calcium-green-2-AM for 1 hour. The antenna of the honeybee was stimulated with 4 µl of octanol for 5 frames (1 s; gray area). Three areas of activity are shown on the map. Sample frequency: 5 fps. The small black square indicates the area used for time-course analysis. 97

Figure 30: Préparation pour l'imagerie calcique. (A) Le grillon est fixé dans une chambre d'enregistrement qui permet d'isoler les cerques de l'abdomen. Ceci permet de garder l'abdomen dans un bain de solution Ringer et les cerques secs afin de ne pas modifier le mouvement des poils. (B) Une boite en Plexiglas® a été placée autour de la préparation afin d'éliminer tout mouvement d'air excepté ceux générés par le système de stimulation sensorielle. 104

Figure 31 : Activité calcique au niveau du TAG du grillon, générée par une stimulation des cerques par un courant d'air (barre grise). Chaque courbe représente la variation de

fluorescence au cours du temps (au cours des 100 images enregistrées par la caméra), pour les deux états du Fura-2AM (courbe d'émission du Fura-2 non lie au calcium en rouge et lié au calcium en bleu). La bande verte correspond aux images 9 à 11 utilisées comme background dans le calcul de la variation de fluorescence. Taux d'enregistrement des images: 5 images par secondes. 107

Figure 32 : (A) Tracé temporel des réponses représentant les variations de fluorescence Δ(F340/F380) au cours du temps (ou des images enregistrées par la caméra). 1 image= 0.2 s. La barre grise représente la stimulation sensorielle. (B) Dérivée première de la courbe 3A, donc la dérivée première de Δ(F340/F380) en fonction des images. Les pics sur la courbe indiquent des variations rapides de Δ(F340/F380), donc une réponse calcique. Taux d'enregistrement des images: 5 images par secondes. 109

Figure 33 : Carte d'activité lors d'une stimulation à 0°. L'échelle de couleur représente la variation de fluorescence, la couleur rouge représente la variation maximale et la couleur bleue la variation minimale. Les valeurs en abscisses et ordonnées correspondent aux pixels, 1 pixels=40µm. Les flèches blanches indiquent les zones pour lesquelles une activité calcique a été observée. 110

Figure 34 : Résultats des paramètres enregistrés pour les différents groupes de grillons. G1: grillons intacts, G2: grillons ayant les yeux couverts, G3: grillons ayant les connectifs coupés (A) Amplitude moyenne ± SEM des signaux calciques (= valeur maximale de Δ(F340/F380)) déclenchés par une stimulation sensorielle. Test de Behrens-Fisher, *: P<0,05. (B) Latence moyenne ± SEM des signaux. 113

Figure 35 : L'importance du cadre écologique dans la compréhension du système de fuite du grillon. (1) L'identité des prédateurs affecte la nature du stimulus perçu par le grillon. (2) L'importance relative d'un stimulus peut être fortement affectée par la qualité de sa transmission dans l'environnement local. La perception du signal a été rattachée au type d'habitat chez les chauves souris et les poissons mais cela n'a pas été documenté chez le grillon. Le bruit de fond peut également perturber la capacité des grillons à extraire les informations des stimuli. (3) Les tactiques de chasse des prédateurs du grillon peuvent être influencées par l'environnement comme cela a été montré pour d'autres prédateurs. (4) Le comportement et la survie des grillons varient en fonction de l'identité des prédateurs et de leurs tactiques d'attaques. En retour, le comportement des grillons peut influencer les tactiques des prédateurs. (5) La morphologie des cerques du grillon est variable parmi les populations de différents environnements (Dangles et al., 2005). (6) Ceci suggère

fortement une influence des prédateurs et/ou des caractéristiques de l'environnement sur la morphologie des cerques et une capacité de ceux-ci à répondre à des pressions de sélection. (7) Le bruit de fond génère une modulation de l'activité des interneurones ascendants. (8) En l'absence des cerques, 48% des grillons détectent l'objet en mouvement et 24% évitent le contact avec l'objet. (9) Les grillons fuient plus efficacement une attaque de l'arrière qu'une attaque de face. Modifié d'après Dangles et al. (2006a). 120

Figure 36 : Schéma de l'interaction neuronale au niveau du TAG générant la modulation de la fréquence de l'activité enregistrée au niveau des connectifs. L'attaque d'un prédateur active un ensemble de poils et donc un ensemble de neurones sensoriels au niveau des cerques. La projection des neurones sensoriels au niveau du TAG va permettre l'extraction d'information sur le stimulus (direction, fréquence…) et l'activation d'interneurones particuliers. L'attaque du prédateur va activer l'interneurone géant (GI) et l'interneurone local (IL). Le bruit de fond va déclencher l'activation de l'IL et d'un interneurone ascendant (IA). L'IL activé par l'attaque du prédateur et le bruit de fond, inhibe le GI. Plus le stimulus de l'attaque du prédateur est puissant, plus l'IL est excité et plus il inhibe le GI. 123

Figure 37 : Instantané et enregistrement électrophysiologique de l'activité nerveuse à la sortie du TAG lors de l'attaque d'une araignée. Le tracé représente l'activité nerveuse au cours du temps et l'instantané correspond au moment indiqué par la flèche rouge. Le tracé noir correspond à l'activité enregistrée avant le moment de l'instantané, et le tracé bleu l'activité enregistrée après. Le parcours de l'araignée est représenté par la flèche en pointillés dont le début est indiqué par l'araignée grise. 129

Figure 38 : Schéma général de connexion du piston. (From SMAC moving coil actuator website) 144

Figure 39 : Vitesse du piston en fonction du temps pour (A) 5 cm/s. (B) 11 cm/s. (C) 15 cm/s. (D) 25 cm/s. (E) 40 cm/s. (D) 50 cm/s. La ligne rouge indique la vitesse considérée.....145

Figure 40 : Distance entre le piston et la pointe du cerque d'un grillon en fonction du temps pour 6 vitesses 5 cm/s (en bleu), 11 cm/s (en jaune), 15 cm/s (en vert), 25 cm/s (en violet), 40 cm/s (en rouge) et 50 cm/s (en noir). Les tracés en pointillés représentent le tracé de la fonction qui a été ajustée aux données expérimentales représentés en trait plein. Les mêmes couleurs en pastel ont été utilisées pour représenter les résultats de chaque vitesse. 146

LISTE DES ANNEXES

ANNEXES ..... **Error! Bookmark not defined.**
Annexe 1 Caractéristiques du piston ..... **Error! Bookmark not defined.**

INTRODUCTION GENERALE

Systèmes sensoriels : détection des prédateurs

Tout organisme est en interaction constante avec son environnement et est capable de percevoir certaines caractéristiques physiques et chimiques de cet environnement grâce à ses organes sensoriels. Les organes sensoriels transforment des signaux internes ou externes en signaux électriques qui sont analysés par le système nerveux. Différents types de récepteurs sensoriels se sont développés. Ces différents types de récepteurs correspondent à une modalité sensorielle et peuvent être classifiés fonctionnellement par le type d'énergie qu'ils vont recevoir. Nous pouvons ainsi définir les détecteurs visuels, les mécanorécepteurs (détecteurs tactiles, de vibrations, du son), les chémorécepteurs (incluant les récepteurs gustatifs et olfactifs), les récepteurs d'humidité, les récepteurs de température, les récepteurs magnétiques et les géorécepteurs. La mécanoréception qui nous intéresse ici, est la perception de la distorsion mécanique du corps. Celle-ci peut aussi bien résulter du contact d'un objet ou de l'impact de vibrations transportées par l'air, l'eau ou le substrat. La mécanoréception comprend donc entre autre, le sens de l'audition ainsi que celui de la proprioception (perception de la position et du mouvement des parties de son propre corps) (Chapman, 1998). La mécanoréception peut également permettre de percevoir des courants d'air. Ceci est possible grâce à des mécanorécepteurs en forme de poils longs et fins appelés poils 'filiformes', qui vont fléchir sous l'effet du courant d'air.

Ce type de mécanorécepteurs est présent chez les insectes et en particulier chez les Blattopteroïdes et les Orthoptéroïdes (ex: les blattes, les grillons, les sauterelles…), sur une structure appelée cerque. Les cerques sont deux appendices situés à l'extrémité postérieure de l'abdomen. Ils sont recouverts de nombreux poils sensoriels à modalités différentes, notamment les poils filiformes qui leurs permettent de détecter les mouvements d'air. Ces poils filiformes permettent ainsi de détecter l'attaque d'un prédateur, par exemple, le déplacement d'une araignée, le battement d'aile d'une guêpe parasitoïde, le déplacement de la langue chez un crapaud...

Pour permettre la transduction de l'information, les récepteurs sensoriels sont connectés au système nerveux. Le système mécanosensoriel des cerques est donc composé des poils filiformes, ainsi que du système nerveux qui traite les informations perçues. Après analyse de ces informations, le système nerveux déclenche une activité motrice adaptée, en particulier un comportement de fuite permettant à l'insecte d'échapper au prédateur.

Pour les fonctions permettant la survie de l'animal, les systèmes sensoriels ont été soumis à de fortes pressions de sélection. Les insectes Blattopteroïdes et Orthoptéroïdes vivent sur terre depuis plus de 250 millions d'années (Grimaldi et Engel, 2005), ils ont donc évolué, se sont adaptés aux prédateurs et aux différentes conditions qu'ils ont rencontrées. Ils ont donc au cours du temps développé des mécanorécepteurs très sensibles, et des comportements leur permettant d'échapper efficacement à leurs prédateurs en détectant le courant d'air produit par leur approche lors d'une attaque.

La détection du prédateur et la fuite

Les informations sur le comportement de fuite et le système sensoriel décrites dans ce chapitre, portent sur différentes espèces d'Orthoptéroïdes et de Blattopteroïdes.

1. Comportement de fuite

Comme nous l'avons expliqué dans le premier paragraphe, les grillons sont capables grâce à leurs poils filiformes, de percevoir l'attaque d'un prédateur. La détection de l'attaque se fait par la perception du mouvement d'air qu'elle génère. Le fait qu'un courant d'air puisse déclencher la fuite à tout d'abord été constaté chez la blatte (Camhi et Tom, 1978; Camhi et al., 1978; Plummer et camhi, 1981; Camhi, 1984). Ces observations ont également été faites chez le grillon quelques années plus tard (Gras et Hörner, 1992). Diverses études ont analysé le comportement de fuite chez ces deux insectes ainsi que les stimuli qui les déclenchent.

a) Variété des comportements de fuite

Différents types de comportement ont été observés lors de la stimulation par un courant d'air :

- lorsque les grillons sont fixés et peuvent se déplacer virtuellement sur une boule en suspension, ils fuient en courant (seule réponse pouvant être générée par ces grillons) (Gras et Hörner, 1992)
- les grillons libres montrent des comportements de
    - rotation (Tauber & Camhi 1995)

- saut (Tauber et Camhi, 1995)
- rotation puis saut (Tauber et Camhi, 1995; Schrader, 2000; Kanou et al., 2006)
- marche (Baba et Shimozawa, 1997)
- retrait (Baba et Shimozawa, 1997)
- ruade (Dumpert et Gnatzy, 1977; Hustert et Gnatzy, 1995)
- soulèvement de l'abdomen (Baba et Shimozawa, 1997)
- soulèvement d'une patte (Baba et Shimozawa, 1997)
- nettoyage des cerques (Baba et Shimozawa, 1997)
- balancement des antennes (Baba et Shimozawa, 1997).

Dans ce travail, nous allons essentiellement nous intéresser aux premiers comportements cités: la course, la marche, la rotation et le saut.

b) Caractéristiques du comportement de fuite

Les grillons et les blattes fuient en direction opposée au stimulus. Ceci a été observé chez les grillons de plusieurs espèces, *Gryllus bimaculatus* (Gras et Hörner, 1992 ; Tauber et Camhi, 1995 ; Kanou et al., 1999), *Troglophilus neglectus* (Schrader, 2000) et *Gryllodes sigillatus* (Kanou et al., 2006). La même constatation a été faite chez la blatte *Periplaneta americana* (Camhi et Tom, 1978 ; Camhi et al., 1978 ; Ritzmann, 1984). Le saut (également utilisé par les sauterelles) a pour avantage par rapport à la rotation (qui est la stratégie caractéristique de la blatte), d'être un mécanisme « explosif » et donc très rapide. Le grillon utilise ces deux stratégies, puisqu'il est à la foi capable de tourner et de sauter (Tauber et Camhi, 1995).

Une grande variabilité de comportements ainsi que de performances ont été observées entre différentes espèces de grillons. Tout d'abord au niveau du comportement de fuite lui-même, *G. bimaculatus* tourne puis saute, alors que *T. neglectus* tourne en sautant (Schrader, 2000). Au niveau de la performance mesurée par le taux de réussite, l'espèce *G. sigillatus* semble plus sensible que l'espèce *G. bimaculatus*. En effet près de 40% de *G. sigillatus* répondent à une vitesse de courant d'air de 1,5 m/s contre 6% de *G. bimaculatus* (Kanou et al., 1999; Kanou et al., 2006). En ce qui concerne la performance mesurée par la précision de la direction de fuite, *G. bimaculatus* semble plus précis que *G. sigillatus* (Kanou et al., 1999; Kanou et al., 2006).

Des expériences d'ablation bilatérale des cerques ont montré le rôle prédominant de ces organes dans le déclenchement de la fuite. Avant l'ablation des cerques 95% des *G. sigillatus* montrent un comportement de fuite, contre 4.1% après l'ablation (Kanou et al., 2006). En ce qui concerne *G. bimaculatus,* le taux de réponse passe de 46% avant l'ablation à 0% après l'ablation (Kanou et al., 1999). Bien que les taux de réponses soient variables entre les deux espèces, l'effet de l'ablation est très important pour les deux. Ces mêmes expériences ont étudié la capacité de compensation de ce système après ablation des cerques. Chez *G. bimaculatus* comme chez *G. sigillatus* après une ablation bilatérale aucune récupération par compensation n'est observée. Cependant une semaine environ après une ablation unilatérale une récupération par compensation est observée, cette récupération est plus importante chez *G. sigillatus* (60% de récupération) que chez *G. bimaculatus* (30% de récupération) (Kanou et al., 1999 ; Kanou et al., 2006). Chez *G. bimaculatus* l'ablation unilatérale affecte moins les juvéniles que les adultes, et plus les grillons sont jeunes moins ils sont affectés par l'ablation (Kanou et al., 2001). La récupération de la précision de la direction de fuite prend plus de temps, puisqu'environ 14 jours sont nécessaires. De plus, il est nécessaire que le grillon puisse avoir une activité motrice afin que les cerques soient stimulés par le déplacement du grillon pour que la récupération ait lieu (Kanou et al., 2002; Kanou et Kondoh, 2004).

c) Les modifications du comportement de fuite

Le comportement de fuite peut être modifié par l'état physiologique de l'animal et son statut social. Les subordonnés sont plus réactifs que les dominants. Une diminution de la sérotonine ou une injection d'opioïdes diminue le taux de fuite des grillons, et d'autre part une inhibition des opioïdes induit une augmentation de la fuite (Dyakonova et al., 1999). Lors de la présence d'une femelle ainsi qu'au cours de la copulation, une diminution du taux de fuite chez le grillon est observée (Killian et al., 2006). Ces résultats montrent que le comportement de fuite n'est pas fixe mais est modulable et peut varier en fonction de certaines conditions.

2. *Les cerques*

a) *Structure*

Les cerques sont deux appendices dérivant du 11ème segment abdominal et donc situés à l'extrémité postérieure de l'abdomen. Chez les orthoptères ces cerques sont simples et non segmentés alors qu'ils sont segmentés chez les blattidés (Chapman, 1998). Ces appendices sont mobiles grâce à des muscles extrinsèques dorsaux (Edwards et Palka, 1974).

Les cerques portent plusieurs types de structures sensorielles, appelées **sensilles**, qui peuvent être classées en fonction de leur taille et de leur morphologie. Chaque type est impliqué dans la détection d'un type particulier de stimuli, tel que les courants d'air (sensilles filiformes), le touché (sensilles bristles), la gravité (sensilles clavates), la déformation de la cuticule (sensilles campaniformes) et les composants chimiques (chémorécepteurs) (Fig. 1).

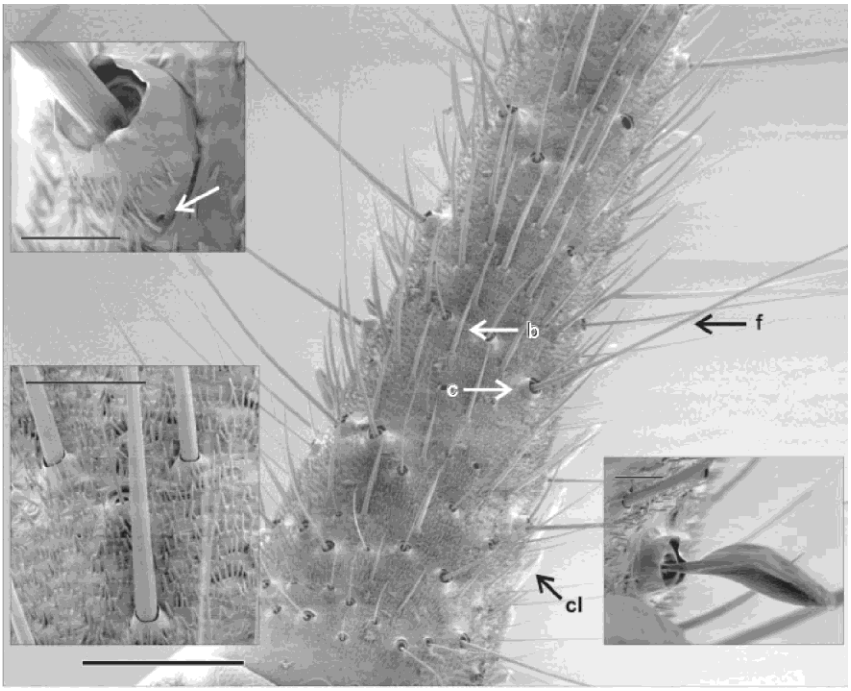

Figure 1: Le cerque du grillon des bois (SEM). b, sensille du type bristle ; c, sensille campaniforme ; cl, sensille clavate ; f, sensille filiforme. Barre d'échelle : 200µm. Les cadres montrent les détails d'une sensille filiforme et d'une sensille campaniforme (flèche) (en haut à gauche), d'une sensille bristle (en bas à gauche) et d'une sensille clavate (en bas à droite).
D'aprés Insausti et al. (2008).

Les poils filiformes sont sensibles aux mouvements d'air et sont donc ceux qui nous intéressent ici. De 400 à 500 poils filiformes dont la taille varie entre 30 et 1500 µm ont été comptés chez *G. bimaculatus* (Shimozawa et Kanou, 1984) et de 1000 à 2000 poils filiformes

atteignant 1500 µm ont été trouvés chez *Acheta domesticus* (Edwards et Palka, 1974 ; Chiba et al., 1992).

La répartition des poils filiformes le long des cerques n'est pas homogène, la densité étant plus importante à la base du cerque (Palka et al., 1977a). Ces poils sont insérés dans une chaussette de cuticule flexible composée de résiline (Edwards et Palka, 1974). La chaussette a une forme ovale et d'un côté se trouve une protubérance cuticulaire appelée « piquet cuticulaire » (Fig. 2 flèche blanche) (Gnatzy et Tautz, 1980 ; Keil, 1998). La base du poil a également une forme elliptique. La forme de la base du poil et de la chaussette, associée à la manière dont le poil est inséré dans la chaussette, va contraindre celui-ci à osciller préférentiellement dans un seul plan (Gnatzy et Tautz, 1980 ; Edwards et Palka, 1974 ; Palka et al., 1977a). Trois groupes de poils ont été décrits, les poils L, qui oscillent dans un plan longitudinal par rapport au cerque et qui ont une chaussette orientée transversalement, les poils T oscillants dans le plan transversal et dont la chaussette est orientée longitudinalement (Palka et al., 1977a) et les poils D, oscillants dans un plan intermédiaire (Gnatzy et Tautz, 1980).

b) Transduction du signal

Chaque poil est associé à un seul neurone sensoriel dont le corps cellulaire se trouve à la base du poil. A l'état de repos, le poil filiforme flotte au centre de la chaussette et est maintenu en place, entre autre par la membrane de jonction ainsi que la pression interne dans l'espace récepteur-lymphe (Fig. 2). Lors d'une stimulation, l'axe du poil fléchi, ce qui engendre une rotation de la base du poil. Le « piquet cuticulaire » (situé à la pointe de la flèche blanche sur la figure 2) va comprimer le corps tubulaire présent à la base du poil. Ce corps tubulaire étant connecté à la membrane dendritique par des microtubules périphériques, sa torsion va activer les dendrites des neurones sensoriels (Fig. 2) (Gnatzy et Tautz, 1980 ; Keil, 1998). Lors d'un mouvement du poil dans le plan préférentiel, le poil va pouvoir s'incliner dans deux directions opposées. Lorsque le poil s'incline du côté du « piquet cuticulaire », comme expliqué précédemment, un potentiel récepteur dépolarisant est produit dans les dendrites (Fig. 3F et J). Lors d'un mouvement du poil dans la direction opposée, c'est un potentiel récepteur hyperpolarisant qui sera produit (Fig. 3G et I) (Gnatzy et Tautz, 1980 ; Keil, 1998).

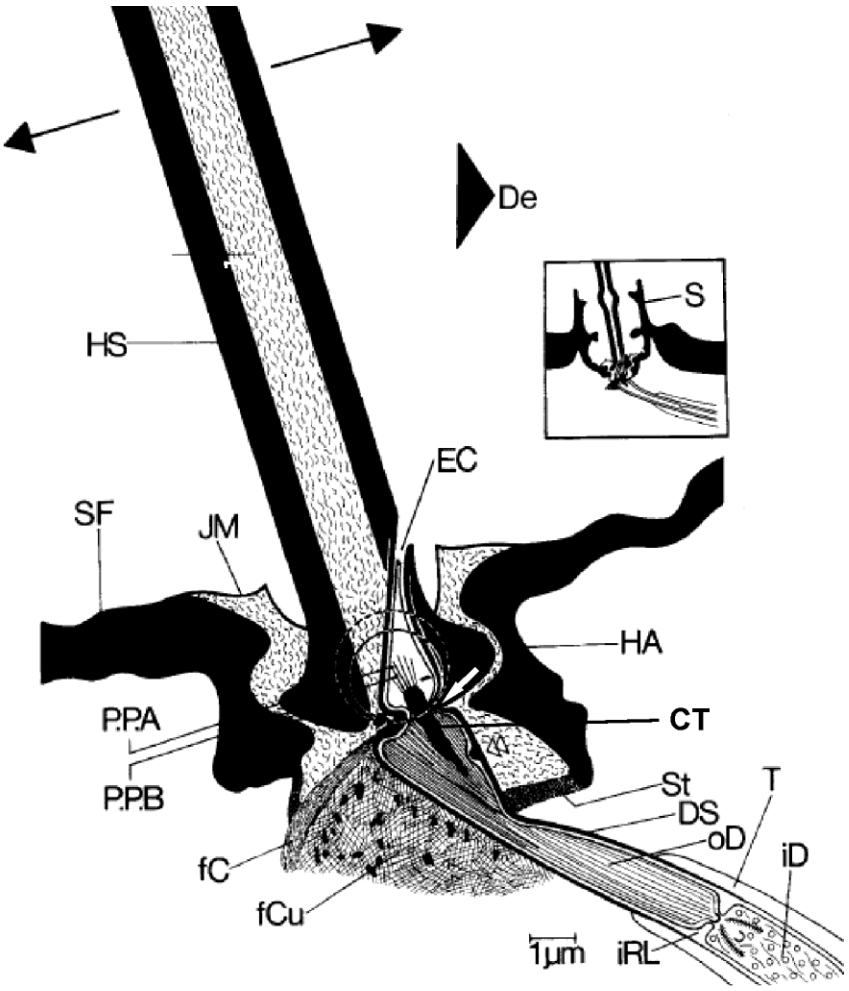

Figure 2: Représentation schématique de la base d'un poil filiforme cercal de *Gryllus* et le mécanisme de transmission du stimulus. Le cercle en pointillé est dessiné autour du plus haut point de rotation possible (P.P.A.) et le cercle en trait plein autour du plus bas (P.P.B.). La flèche blanche pointe dans la direction du déplacement de l'axe du poil dont la compression résultante du corps tubulaire par le piquet cuticulaire est la plus efficace. Le piquet cuticulaire se trouve à la pointe de la flèche blanche. Capsule fibreuse (fC) ; coussin fibreux (fCu) ; côté de la dépolarisation (De) ; intérieur (iD) et extérieur (oD) du segment dendritique ; gaine dendritique (DS) ; axe du poil (HS) ; articulation du poil (HA) ; membrane de l'articulation (JM) ; montant cuticulaire (St) ; cellule thecogène (T) ; corps tubulaire (CT) ; direction préférée du poil (flèches) ; épaississement proximal de la gaine dendritique (⇨); nervure cuticulaire de la gaine dendritique (⇶) ; Canal ecdysial (EC) ; plancher de la chaussette (SF); espace interne récepteur-lymphe (iRL) ; Cadre : vue plus précise de la chaussette du poil (S) et d'un dendrite d'un poil filiforme cercal. D'après Gnatzy et Tautz (1980).

c) Le codage des paramètres du courant d'air par les poils

La description de la structure des poils filiformes, ainsi que du mécanisme de transduction présentées dans les paragraphes précédents, nous ont permis de décrire le codage de deux paramètres du courant d'air : le plan et la direction dans lequel souffle le courant d'air. Le plan dans lequel se déplace le courant d'air est identifié grâce au plan préféré dans

lequel peut osciller chaque poil. Une agrégation des poils en fonction de la direction préférée a été observée (Landolfa et Jacobs, 1995 ; Palka et al., 1977a). Les poils T se retrouvent préférentiellement sur les faces dorsales et ventrales, alors que les poils L sont préférentiellement localisés sur les faces médianes et latérales. Enfin, les poils se trouvant entre ces régions (poils D) vibrent dans un plan intermédiaire (Palka et al., 1977a).

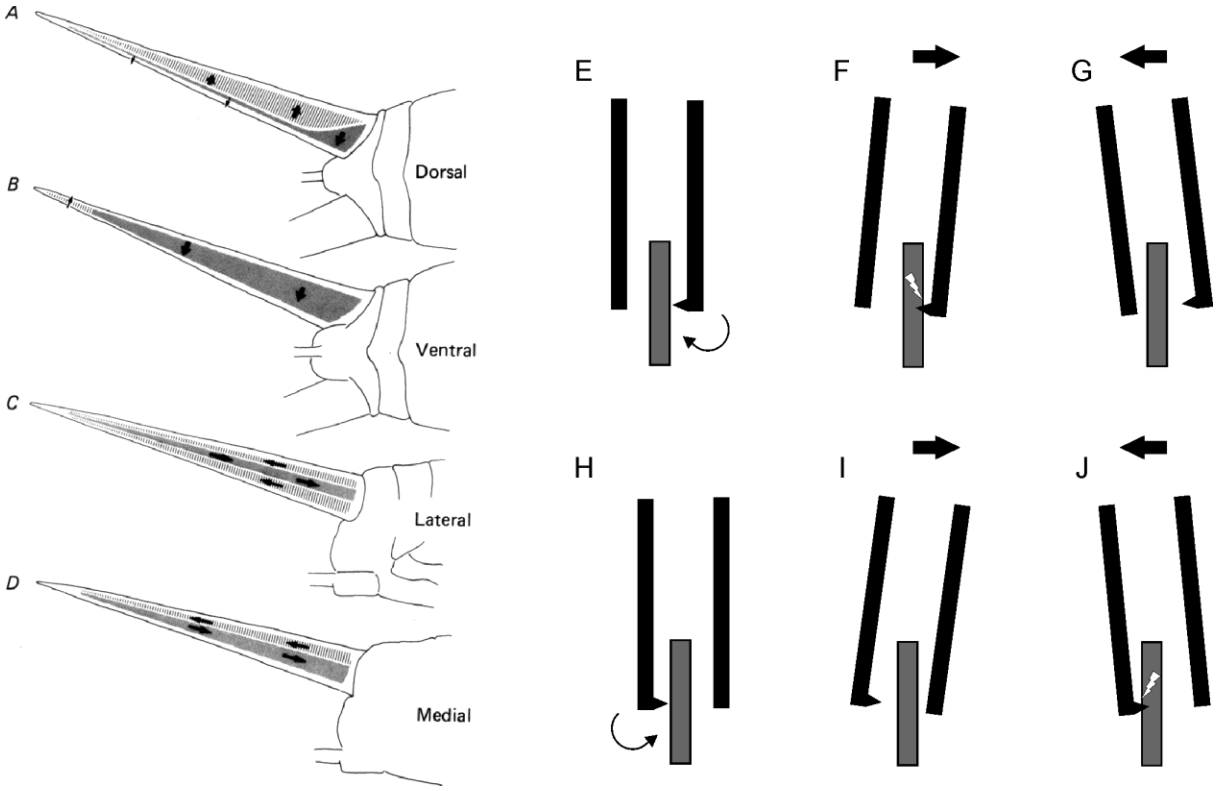

Figure 3 : Localisation des quatre types de poils sur le cerque. (A) Cerque dorsal. Les poils T latéraux sont retrouvés sur une petite région proximale qui s'étend distalement comme une étroite bande en position médiane par rapport à la ligne médiane dorsale. Le reste répondant mieux à un vent en direction médiane. Les flèches représentent la sensibilité directionnelle des poils de la région. (B) Cerque ventral. La plupart des poils T ventraux sont sensibles à un vent latéral, bien que quelques uns à la pointe distale sont sensibles à un vent médian. (C) Cerque latéral extérieur. Une bande étroite de poils L postérieurs est bordée par deux bandes de poils L antérieurs. (D) Cerque latéral intérieur. La plupart des poils L médians sont sensibles à un vent postérieur à part une bande plus petite et plus dorsale qui est sensible à un vent antérieur. De Gnatzy et Tautz (1980). (E à J) Représentation schématique de la relation spatiale entre le piquet cuticulaire et le corps tubulaire induisant la réponse directionnelle. Le piquet cuticulaire doit induire une pression sur le corps tubulaire pour induire une activation nerveuse. Lorsque le piquet cuticulaire se trouve à droite, une inclinaison vers la droite induit une activation des neurones (F). Lorsque le piquet cuticulaire se trouve à gauche c'est une inclinaison vers la gauche qui induit une activation des neurones (J).

Pour un plan de déplacement du courant d'air, deux directions sont possibles. La direction de déplacement du vent est identifiée grâce à la structure du poil et surtout par la position du « piquet cuticulaire » (Fig. 3). Pour chaque axe préféré, on a en effet deux types

de poils pour lesquels la position du piquet cuticulaire est opposée (Fig. 3E et H) permettant de distinguer les deux sens de propagation du vent (Fig. 3). Une agrégation des poils selon qu'ils répondent pour un sens ou l'autre a été observée (Landolfa et Jacobs, 1995). La figure 3 représente le sens pour lequel les poils répondent dans différentes régions des faces dorsales et ventrales pour les poils T, et latérales extérieures et latérales intérieures pour les poils L (Bacon et Murphey, 1984). Chaque poil ayant une sensibilité spécifique au plan et à la direction de propagation du courant d'air, l'ensemble des poils présents sur chaque cerque permet de percevoir des courants d'air sur 360°.

Un courant d'air peut être défini par sa vitesse, son accélération ainsi que sa fréquence (transformée de Fourier de la vitesse du vent dans le temps). Ces paramètres déterminent le déplacement du poil, en fonction de sa longueur. Chez *Grillus bimaculatus* les poils courts (< 500 µm) ne sont pas activés par des courants d'air de faible fréquence. Ils sont par contre sensibles à l'accélération. Les poils longs (≥ 500 µm) sont activés par des courants d'air de faible fréquence et sont sensibles à la vitesse du courant d'air (Shimozawa et Kanou, 1984).

3. *Le système nerveux*

Chaque poil filiforme est relié à un neurone sensoriel bipolaire par le corps tubulaire. Le corps cellulaire de ces neurones se trouve à la base du poil et l'ensemble des axones forment le nerf cercal (par lequel passent également des neurones provenant d'autres sensilles) rejoignant le ganglion abdominal terminal (TAG) (Fig. 4). Environ 10000 axones de neurones sensoriels ont été comptés dans le nerf cercal chez *A. domesticus* (Edwards, 1971 ; Edwards et Palka, 1974). Ces neurones sensoriels sont activés par une large gamme de fréquences allant de 5 à 1000 Hz (Roddey et Jacobs, 1996).

Chez le grillon, le système nerveux central est composé du cerveau antérieur et de la chaîne nerveuse ventrale, elle-même constituée du ganglion suboesophagial, trois ganglions thoraciques (un par segment du thorax) et 5 ganglions abdominaux. Le TAG, le dernier ganglion de la chaine ventrale, provient de la fusion de 4 ganglions (7ème au 10ème) (Edwards et Palka, 1974 ; Mendenhall et Murphey, 1974).

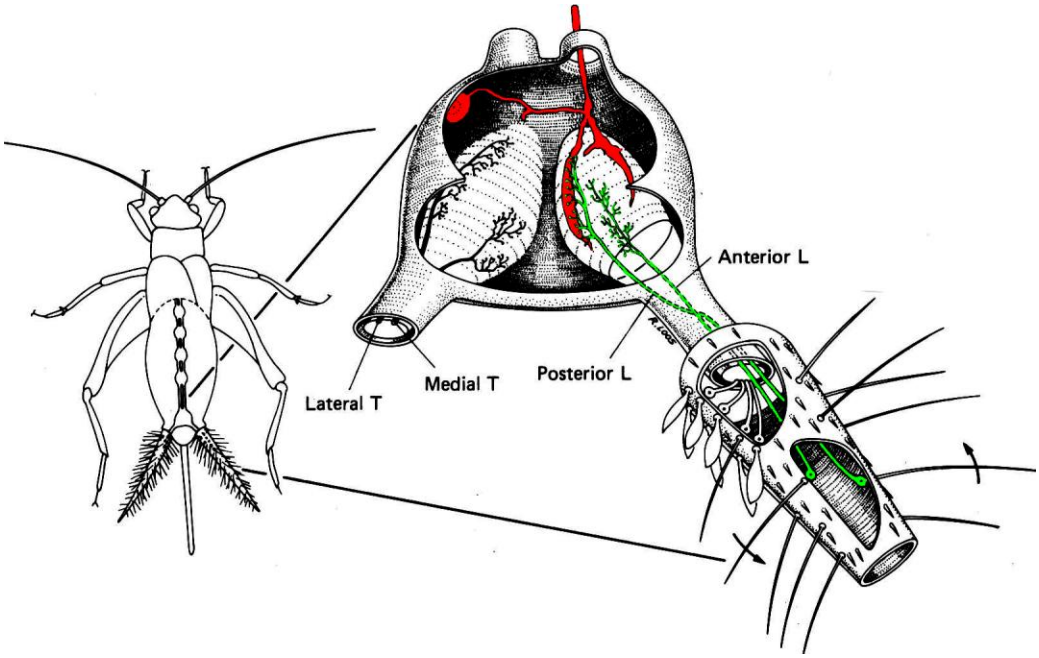

Figure 4 : Schéma du système cerque-interneurones géants. Le dessin de gauche montre la vue d'un grillon ouvert avec le système nerveux central exposé. Le dessin de droite est la vue du TAG coupé, montrant les projections de deux neurones afférents (sensoriels) (en vert) ainsi qu'un GIN, MGI (en rouge). Il est à noter que l'afférent postérieur L est en contact avec le MGI mais pas l'afférent antérieur L. Modifié d'après Bacon et Murphey (1984).

A l'intérieur du TAG, les axones sensoriels vont se connecter à des interneurones dans des régions discrètes dédiées à l'intégration des informations, les **neuropiles**. Deux neuropiles sont décrits dans le TAG. Les neurones sensoriels des poils filiformes rejoignent un des deux neuropile du TAG appelé glomérule cercal (Bacon et Murphey, 1984) (Fig. 4). Les neurones sensoriels se projettent toujours dans l'hémiganglion ipsilatéral (Edwards et Palka, 1974). C'est au niveau de ce neuropile que les axones sensoriels se connectent aux interneurons locaux et aux neurones de projection. Les neurones de projection amènent l'information aux centres supérieurs du système nerveux central du grillon, en particulier les ganglions thoraciques et les zones d'intégration du cerveau (Jacobs et al., 2008). Parmi la centaine d'interneurones quittant le TAG (Baba et al., 1991), certains sont de très grande taille et appelés interneurones géants (GINs) (Fig. 4). Chez *A. domesticus* 10 GINs ont été décrits, possédant des axones de 20 à 40 µm de diamètre (Edwards et Palka, 1974). Les corps cellulaires des neurones géants sont toujours localisés dans l'hémiganglion controlatéral à l'axone (Mendenhall et Murphey, 1974). La position de l'axone de chaque GIN dans le connectif ainsi que son arborisation au sein du TAG est maintenue d'un individu à l'autre d'une même espèce (Mendenhall et Murphey, 1974). L'étude morphologique du développement embryonnaire du système nerveux des grillons a permis de déterminer le

segment dont chacun des GINs provient, et leur dénomination a été faite à partir de leur origine (ex. le neurone 10-1 est issu du 10ème segment) (Fig. 9). Parmi les GINs, ce sont les deux plus gros appelés LGI et MGI qui ont été les plus étudiés. Les poils filiformes courts semblent converger vers des interneurones à gros diamètres, et les poils longs vers des interneurones de plus petits diamètres (Shimozawa et Kanou, 1984).

a) Le codage des paramètres du courant d'air par le système nerveux

Chaque poil filiforme étant associé à un neurone sensoriel, celui ci est sensible à certains paramètres du courant d'air tels que le plan de déplacement, la direction, la vitesse, l'accélération (Tobias et Murphey, 1979). Ces sensibilités particulières lui sont directement conférées par les caractéristiques physiques du poil que nous avons décrit précédemment (cf. partie 2c de ce chapitre). Dès 1974, Edwards et Palka ont observé des directions préférentielles chez les GINs. Différentes études analysèrent cette aptitude des GINs, en particulier du LGI et du MGI, en neutralisant certains poils (Palka et Olberg, 1977 ; Matzumoto et Murphey, 1977 ; Tobias et Murphey, 1979). En 1984, Bacon et Murphey montrèrent que les neurones sensoriels sensibles à une même direction de stimulation se projetaient sur une même région du glomérule cercal du TAG (Bacon et Murphey, 1984). Il fut également observé que l'inactivation de certaines parties de l'arborisation dendritique des GINs induit une modification de la sélectivité à la direction (Jacobs et Miller, 1985). De ces observations découla l'hypothèse selon laquelle la spécificité des GINs pour une direction de stimulation serait du à un profil particulier de connections entre les neurones sensoriels et les GINs (Jacobs et Miller, 1985). Cette hypothèse à depuis été confirmée par un très grand nombre d'études anatomiques et électrophysiologiques (Jacobs et al., 1986 ; Miller et al., 1991 ; Jacobs et Theunissen, 1996).

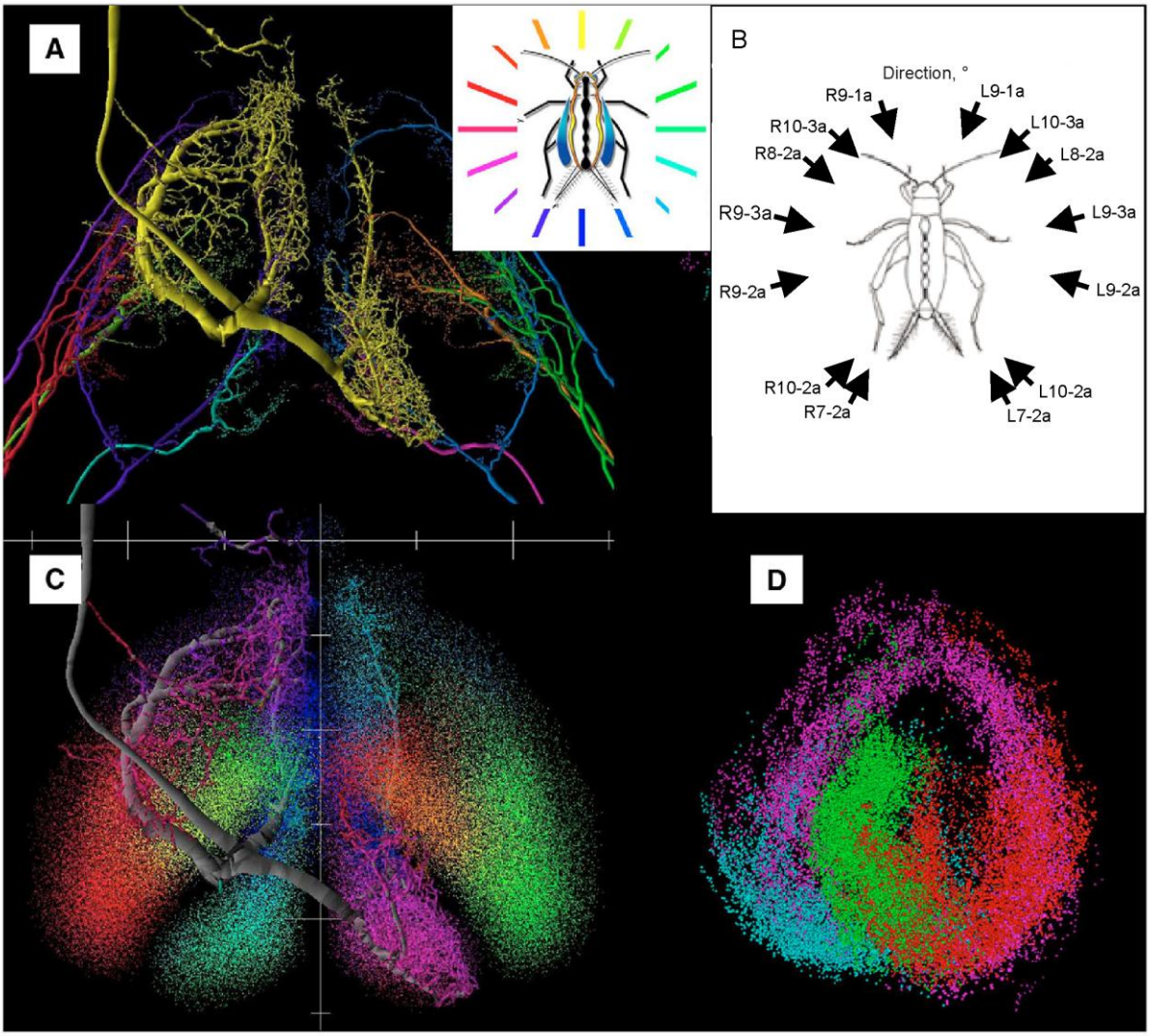

Figure 5: Prédiction anatomique des connections synaptiques entre les neurones afférents sensoriels filiformes et les interneurones. (A) Reconstruction de l'interneurone droit (R) 10-2 représenté en jaune. Arbre afférent de 12 poils filiformes différents représentés en couleurs. La couleur de chaque afférent correspond à la direction du pic d'activation. Ces 12 classes couvrent la gamme de toutes les classes de sensibilité directionnelle des récepteurs. Le dessin dans le cadre montre le code de couleurs qui indique la direction préférée du stimulus par rapport au corps du grillon. (B) Direction préférée des différents interneurones géants. (C) Image de la carte afférente de la direction du courant d'air, pour les deux cerques à la fois, avec une image sur la carte du modèle de compartimentation de l'interneurone 10-2. Chaque classe de direction des arborisations afférentes sont transformées en un « nuage statistique » correspondant à la densité des terminaisons synaptiques pour cette direction du stimulus. Ceci apporte une démonstration directe de la carte neurale de la direction. La superposition entre les interneurones sensoriels avec la carte de la direction des courants d'air des afférents prédit les connections synaptiques des afférents sur ces interneurones. Ici les dendrites des interneurones sont masquées par la couleur correspondante au nuage statistique des synapses afférentes de cette région. (D) Image de la distribution des boutons synaptiques de la population des afférents sensoriels du neurone gauche, dont les couleurs représentent différentes directions du courant d'air du cerque gauche. Vue sagittale. Les varicositées forment une structure continue tridimensionnelle dans le neuropile. Il est à noter que le pic directionnel des varicositées change continuellement avec la localisation le long de la structure. En partant du haut de la structure (rose) et en se déplaçant suivant le sens des aiguilles d'une montre [rouge, jaune (à l'extérieur de la vue), vert et bleu]. D'après Jacobs et al. (2008).

Ce profil de connexion a été précisé, et on parle aujourd'hui d'une carte neuronale de la direction du stimulus au niveau du TAG. Cette carte a une forme de spirale sur laquelle s'organisent les arborisations des neurones sensoriels et les différentes directions sont représentées de manière continue le long de la spirale (Fig. 5) (Jacobs et Theunissen, 1996). Les arborisations dendritiques des GINs sont localisées dans des zones particulières de la carte, formée par les neurones sensoriels, ce qui leur permet d'extraire la direction du courant d'air et de présenter eux même une sélectivité à la direction (Jacobs et Theunissen, 2000 ; Jacobs et al., 2008). La sélectivité à la direction est aujourd'hui connue pour 14 GINs d'*A. domesticus* (Fig. 5) (Jacobs et al., 2008).

Toutes ces études nous permettent aujourd'hui de comprendre le codage neuronal de la direction du courant d'air de manière précise. Des études utilisant des outils mathématiques et informatiques basés sur des modèles, tentent maintenant de comprendre le codage d'autres paramètres (Dimitrov et al., 2002). Le codage de la fréquence au niveau du TAG a été analysé et aucune carte spatiale n'a pu être décrite, les neurones sensibles à une même fréquence ne semblant pas s'agréger (Paydar et al., 1999). Crook et al., (2002), étudièrent également ce codage de la fréquence. Leurs analyses indiquent que la sensibilité à la fréquence serait liée à la structure électrotonique passive des arborisations dendritiques, ainsi qu'à la sensibilité dynamique de la zone d'initiation des potentiels d'action. D'autre part, le codage neuronal de la vitesse et de l'accélération n'ont jamais été étudié, bien que nous sachions que les poils présentent une sensibilité variable à ces paramètres en fonction de leur longueur (cf partie 2c de ce chapitre).

b) Autres mécanismes de traitement des informations sensorielles au sein du TAG.

Les GINs peuvent être activés ou inhibés par la stimulation de certains poils. Par exemple, les poils T ipsilatéraux activent le MGI, le LGI, ainsi que deux autres GINs 10-2 et 10-3. Les poils T controlatéraux et L ipsilatéraux inhibent 10-2, 10-3 et LGI, et excitent MGI (Palka et Olberg, 1977 ; Levine et Murphey, 1980). Ces mécanismes d'inhibition par les neurones sensoriels, donc d'inhibition présynaptique, permettraient d'affiner la sélectivité à la direction. Un autre rôle de ces mécanismes d'inhibition serait de protéger le système de la dépression synaptique qui peut avoir lieu lors de fortes stimulations des cerques par le mouvement propre du grillon ou en présence d'une forte stimulation de fond (Levine et Murphey, 1980).

Les GINs ne sont pas les seuls interneurones de projection présents dans le système des cerques, de nombreux interneurones de taille inférieure répondent également à des stimulations mécanosensorielles. Les réponses observées peuvent être excitatrices ou inhibitrices et ces interneurones présentent une sélectivité à la direction du stimulus (Baba et al., 1991). Le traitement des informations sensorielles se fait également grâce aux interneurones locaux. Des interneurones locaux sensibles à certains paramètres du stimulus tels que la vitesse et la direction ont été identifiés au niveau du TAG du grillon (Bodnar et al., 1991).

Des mécanismes de plasticité synaptique tels que la facilitation et la dépression ont été observés au niveau des synapses, entre les neurones sensoriels et les GINs. Ces mécanismes sont affectés par les neurones pré et post-synaptiques, ainsi que par l'âge de la synapse (Davis et Murphey, 1993 ; Hill et Jin, 1998).

Les réponses des neurones sensoriels associés à des poils situés à l'extrémité des cerques, atteignent le TAG avec un certain retard, par rapport aux réponses des neurones sensoriels associés à des poils situés à la base des cerques. Ce retard ou délai provient de la distance supérieure que le premier a à parcourir. Le cerque pourrait ainsi jouer le rôle de « delay line » et les GINs pourraient intégrer et utiliser ce délai dans le codage du stimulus (Jacobs et al., 2008).

Problématique : bruit de fond et considérations écologiques

Jusqu'à présent, très peu d'études intégrèrent les éléments écologiques et évolutifs dans la compréhension du système cercal (Dangles et al., 2006a). Cependant ceux-ci influencent les systèmes sensoriels et donc le système cercal de plusieurs façons, comme cela est illustré sur la figure 6. De plus, la faible variabilité structurale des poils filiformes, l'importance pour la survie, le lien entre la structure et la fonction des cerques amènent à penser que ce système sensoriel a été soumis à une forte pression de sélection, et qu'il est proche d'un optimum du point de vue mécanistique (Jacobs et al., 2008). La variabilité observée entre populations d'une même espèce renforce l'idée que ce système est proche d'un optimum dans les conditions dans lesquelles la population se trouve (Dangles et al., 2005). L'intégration de connaissances écologiques permettrait une meilleure compréhension du système cercal. De plus l'utilisation de stimuli inadaptés peut générer des artéfacts dans les réponses et donc des erreurs d'interprétation (Wehner, 1987). Un exemple concret et directement lié à notre sujet est donné par une caractéristique qui était admise depuis

longtemps selon laquelle les poils les plus longs sont les plus sensibles (Shimozawa et Kanou, 1984). En fait ceci n'est vrai que pour des stimulations oscillatoires. Il semble en effet selon de nouvelles études que pour des stimulations non-oscillatoires, à l'inverse, les poils les plus courts sont les plus sensibles (Kant et Humphrey, 2008). Si l'on part du point de vue de la détection du prédateur, les caractéristiques physiques de l'environnement sont très complexes et les stimuli pertinents dans la perception de l'attaque des prédateurs peuvent être très variés. Le grillon peut utiliser et comparer toutes les informations sensorielles auxquelles il a accès, provenant de plusieurs récepteurs d'une même modalité, ainsi que de différentes modalités. L'utilisation de stimuli adéquats permet une interprétation correcte des réponses enregistrées et peut permettre d'étudier plus finement certaines capacités du système.

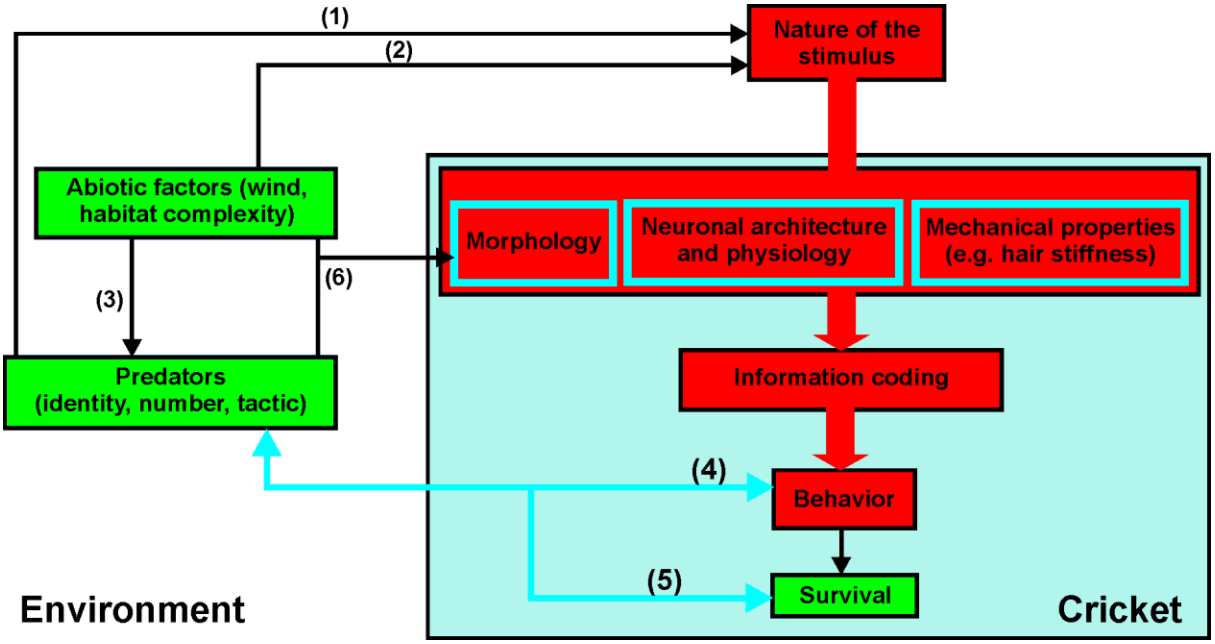

Figure 6: L'importance du cadre écologique dans la compréhension du système de fuite du grillon. (1) L'identité des prédateurs affecte la nature du stimulus perçu par le grillon. (2) L'importance relative d'un stimulus peut être fortement affectée par la qualité de sa transmission dans l'environnement local. La perception du signal a été rattachée au type d'habitat chez les chauves souris et les poissons, cela n'a pas été documenté chez le grillon. Le bruit de fond peut également perturber la capacité des grillons à extraire les informations des stimuli. (3) Les tactiques de chasse des prédateurs du grillon peuvent être influencées par l'environnement comme cela a été montré pour d'autres prédateurs. (4) Le comportement et la survie des grillons varient en fonction de l'identité des prédateurs et de leurs tactiques d'attaques. En retour le comportement des grillons peut influencer les tactiques des prédateurs. (5) La morphologie des cerques du grillon est variable parmi les populations de différents environnements (Dangles et al., 2005). (6) Ceci suggère fortement une influence des prédateurs et/ou des caractéristiques de l'environnement sur la morphologie des cerques et une capacité de ceux-ci à répondre à des pressions de sélection. D'après Dangles et al., (2006a).

L'étude réalisée par Gnatzy et Heuβlein en 1986 est la première à s'être placée dans des conditions naturelles. Il a montré l'implication des cerques et des antennes dans la réponse de défense face à l'attaque de guêpes parasitoïdes. Différentes études précédentes réalisées dans notre laboratoire ont analysé la réponse de fuite en milieu naturel (e.g. Dangles et al. 2006b).

Une des caractéristiques du milieu naturel est la présence de bruit environnemental. Ce bruit environnemental est omni présent dans la nature, variable et peut être plus puissant que les faibles mouvements d'air générés par l'attaque du prédateur. Toutefois, les grillons sont capables de percevoir l'attaque du prédateur dans de telles conditions bruitées. Cette capacité surprenante a été très peu étudiée. Les études ont été réalisées en laboratoire dans des conditions éloignées des conditions naturelles (Plummer et Camhi, 1981 ; Levin et Miller, 1996 ; Clague et al., 1997). Ces expériences ont montré l'implication de certains mécanismes tels que la résonance stochastique (Levin et Miller, 1996), l'adaptation (Clague et al., 1997) dont il est difficile de savoir s'ils se produisent dans les conditions naturelles.

Objectif

L'objectif général de ce travail de thèse a été de mieux comprendre comment le système cercal permet aux insectes qui le possèdent de détecter l'attaque des prédateurs dans leur milieu naturel. Nous avons donc étudié le fonctionnement du système cercal et le comportement de fuite en prenant en compte les conditions écologiques de l'habitat naturel des grillons. Pour cela nous avons choisi comme modèle d'étude une espèce nous donnant accès à son milieu naturel et pour lequel nous avions de bonnes connaissances écologiques, *Nemobius sylvestris*. De plus nous avons utilisé comme système de stimulation un dispositif capable de reproduire les courants d'air générés par l'attaque d'un prédateur naturel. Le fonctionnement ainsi que certaines caractéristiques du piston sont détaillés dans l'annexe 1.

La première partie de ce travail décrie le modèle étudié. Dans la deuxième partie nous avons étudié par des expériences comportementales la fuite du grillon, ainsi que l'importance des cerques par rapport aux autres organes sensoriels dans la détection de l'attaque. La troisième partie analyse la perception de l'attaque au niveau neuronal en milieu naturel. La quatrième partie expose les résultats de l'activité calcique enregistrée au niveau du TAG ainsi qu'un logiciel permettant l'analyse de données obtenues par des techniques optophysiologiques. Finalement, nous discuterons nos résultats avec une perspective écologique et d'interaction proie-prédateur.

PREMIERE PARTIE

Nemobius sylvestris, le modèle d'étude

Nous avons réalisé ces études sur une espèce de grillon sauvage *Nemobius sylvestris* (Bosc). L'utilisation de cette espèce nous permet d'utiliser des individus sauvages. Son milieu naturel étant facilement accessible, il est possible de réaliser des études comportementales et neurobiologiques directement sur le terrain. D'autre part, ce grillon est depuis quelques années le sujet d'études sur l'écologie (Dangles et al., 2006a), la neuroanatomie (Insausti et al., 2008), l'anatomie des cerques (Dangles et al., 2005) et la modélisation mathématique des cerques et des mouvements d'air (Steinmann et al., 2006 ; Magal et al., 2006). Cela permet une intégration de toutes ces informations, et une vision plus complète du système des cerques, intégration qui n'a jamais été faite pour les autres espèces d'orthoptères.

Biologie de *Nemobius sylvestris*

N. sylvestris (Fig. 7) est un insecte de l'ordre des orthoptères ensifères et de la famille des Gryllidae. Il est communément appelé 'grillon des bois'. C'est un grillon de couleur brune et de petite taille (7 à 10 mm).

Figure 7 : Photo d'une larve de *Nemobius sylvestris* et de son prédateur principal l'araignée loup *Pardosa sp*.

1. *Distribution géographique et habitat*

N. sylvestris est présent sur toute l'Europe occidentale, du nord de l'Afrique jusqu'en Angleterre. Il est présent en très grande densité pouvant atteindre 400 individus par m² (Gabbutt, 1959). Il est fortement présent en France où il vit dans la litière des bois ainsi que dans les prairies et les landes (Bellman et Luquet, 1995). Il a également été observé dans les pinèdes et les brousses (Dangles et al., 2005). Il se déplace peu, un individu couvrant une distance ne dépassant pas 20m (Campan et al., 1975). Ces grillons passent leur temps pendant la journée à fourrager dans le substrat de structure tridimensionnelle complexe que constitue une litière ou un sol de prairie. Les grillons modifient leur comportement de fourragement ainsi que leur distribution verticale dans le substrat en fonction du type de prédation auquel ils sont soumis (Dangles et al., 2005). En présence de prédateurs, les grillons juvéniles sont moins présents à la surface des feuilles afin de diminuer le risque de les rencontrer (Dangles et al., 2006a). De plus, ces grillons en observant leurs congénères réalisent de l'apprentissage social. Ceci signifie qu'en observant le comportement d'autres grillons qui ont perçu un prédateur et se sont cachés dans la litière, ils se cachent aussi afin de ne pas rencontrer le prédateur (Coolen et al., 2005).

Les grillons les plus jeunes (des stades plus précoces) sont plus soumis à la prédation des araignées, qui préfèrent des proies dont la taille représente la moitié de la leur (Nentwig, 1987 ; Dangles et al., 2006a). *N. sylvestris* présente une tendance scototactique, c'est à dire qu'il s'oriente spontanément en direction d'éléments de faible réflectance. De plus lors des comportements de fuite, les grillons ont tendance à se diriger vers les arbres comme point de repère, et plus particulièrement les troncs (Campan et al., 1975).

2. *Cycle de vie*

Les différents stades larvaires présents en France ont été décrits par Raymond Campan en 1965. Il a distingué 9 stades larvaires en prenant comme critère la longueur du fémur postérieur. La figure 8A représente la distribution des tailles de fémurs postérieurs. On voit très clairement se distinguer 6 tailles qui apparaissent fortement représentées dans la nature. Ces 6 tailles correspondent aux 6 premiers stades larvaires décrits par Raymond Campan. Le septième stade a également été caractérisé par la taille du fémur postérieur mais les stades 8 et 9 ont été déterminés par la mesure des fourreaux alaires. Dans cette même étude, Raymond

Campan a également étudié le cycle de vie du grillon et a ainsi décrit la présence et la succession des différents stades au cours d'une année (Fig. 8B). Le cycle de *N. sylvestris* s'étend sur deux ans. Les femelles pondent les œufs au cours de l'été et de l'automne de l'année 1. Pendant l'hiver les œufs restent en diapause. Les œufs éclosent l'été de l'année 2 au mois de juillet (Fig. 8B). L'œuf s'ouvre par une fente longitudinale (Chopard, 1938). Les larves se développent pendant le reste de l'été et de l'automne jusqu'au 5ème et 6ème stade en moyenne (Fig. 8). Les larves restent en diapause pendant l'hiver. Au printemps de l'année 3, les larves recommencent leur développement qui se poursuit jusqu'à atteindre le stade adulte pendant l'été de l'année 3, au mois de juillet et août (Fig. 8B). Les adultes pondent alors la nouvelle génération d'œuf pendant l'été et l'automne. La diapause de l'embryon ainsi que de l'œuf sont dépendantes de l'abaissement de la température ainsi que de facteurs internes (Chopard, 1938).

Deux générations se superposent, à la fin de l'été sont présents les œufs de l'année 3 et les larves (dont les œufs ont été pondu l'année 2). Au printemps sont présents les adultes qui ont passé l'hiver (dont les œufs on été pondu l'année 1) ainsi que les larves (dont les œufs ont été pondus l'année 2). Plus rarement les 3 générations peuvent se superposer lorsque les vieux adultes passent l'été jusqu'à ce que de nouveaux œufs soient pondus (Gabbutt, 1959 ; Campan, 1965). Le cycle annuel du grillon dépend en effet fortement des conditions externes (Chopard, 1938).

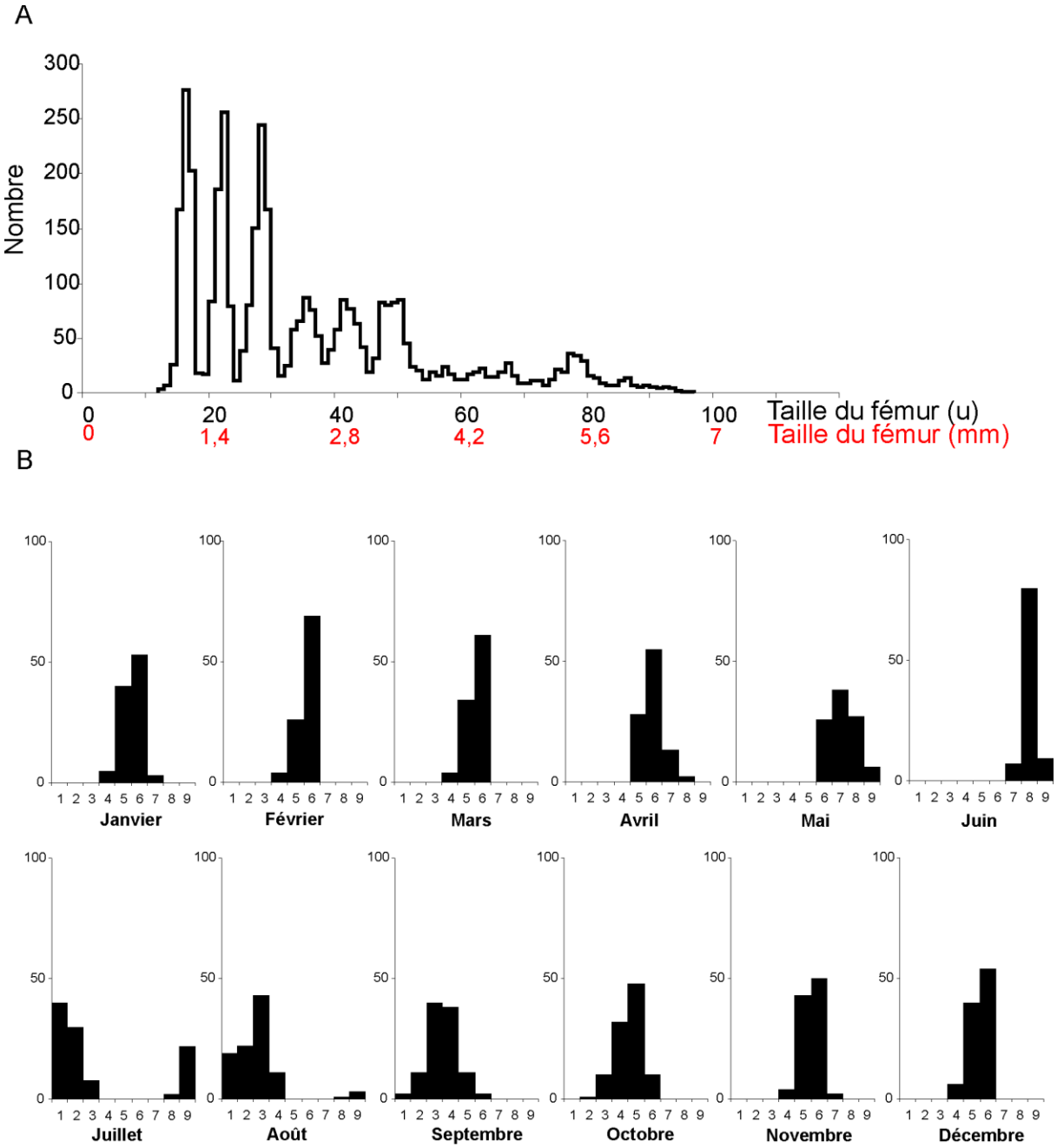

Figure 8 : (A) Histogramme représentant les mesures de la longueur des fémurs postérieurs de *N. sylvestris* au cours de la croissance larvaire. En abscisses les tailles en unités micrométriques (en noir) et en mm (en rouge). En ordonnée les effectifs. (B) Cycle biologique de *N. sylvestris* dans la région toulousaine. Chaque histogramme mensuel figure les proportions relatives des différents stades larvaires présents dans les récoltes faites dans la nature. D'après Campan (1965).

3. *Nutrition*

Les grillons *N. sylvestris* semblent être omnivores. Des observations sur le terrain et en laboratoire montrent qu'ils se nourrissent de feuilles de différents arbres (dont le chêne, chèvrefeuille, peuplier, orme, noyer…), de champignons, de glands, de fruits, d'insectes

morts et de larves d'insectes (Gabbut, 1959). De plus, des études du contenu du jabot et du gésier montrent que ces grillons se nourrissent principalement d'éléments d'origine végétale, mais des champignons et des graines ont également été trouvés dans de nombreux individus analysés. Les grillons montrent une préférence pour les feuilles sèches par rapport aux feuilles vertes et préfèrent celles du chêne (Touratier, 1951).

Prédateurs

N. sylvestris a des prédateurs nombreux et variés. Sur le terrain, ils sont attaqués par plusieurs espèces d'araignées : *Lycosa sp.*, *Pisaura mirabilis*, *Salticus scenicus* et *Trochosa sp.* Des myriapodes (*Geophilus carpophagus* et *Lithobius duboscqui*), des coléoptères (*Notiophilus rufipes*) et des pseudoscorpion (*Neobisium muscorum*) ont été observé se nourrissant de ces grillons. Les grillons juvéniles des stades précoces (stade 1 à 5) sont préférés par ces différents prédateurs (Gabbut, 1959). Les guêpes parasitoïdes (Sphecidae) s'attaquent également aux grillons (Gnatzy, 1996 ; Gnatzy et Kämper, 1990). Enfin les oiseaux, les grenouilles, les crapauds, et les lézards peuvent également se nourrir de grillons. Dans les forêts de la région de Tours, une très forte densité d'araignées loups P*ardosa sp.* (Fig. 7) est observée pouvant atteindre 50 individu/m². Dangles et al. (2006a) ont analysé la prédation de ces araignées sur les grillons et ont montré que ces araignées représentent un des principaux prédateurs de ces grillons. De plus, les grillons sont moins présents à la surface des feuilles en présence d'araignées loup. Ceci nous montre qu'ils sont bien une proie de ces araignées et qu'ils se réfugient dans la litière afin de se cacher de ce prédateur (Coolen et al., 2005).

Système cercal et comportement de fuite

N. sylvestris possède 60 poils filiformes au premier stade larvaire. Ce nombre augmente progressivement, pour atteindre 322 à l'âge adulte. Le système cercal des grillons du premier stade semble être fonctionnel (Dangles et al., 2006b). Au cours du développement ontogénique, l'acuité sensorielle de ce système semble augmenter de manière linéaire. La taille des poils filiformes augmente et une distribution bimodale des poils apparaît au cours du développement larvaire et est clairement observée chez l'adulte. L'augmentation du nombre de poils ainsi que l'augmentation de la taille des poils va permettre l'augmentation de la

sensibilité du système, en particulier une meilleure sensibilité aux courants d'air de faibles vitesses. Toutefois, certains paramètres comme la sensibilité à différentes fréquences de stimulation restent constant selon le modèle de Dangles et al. (2006b). Les poils longs (≥ 500µm) sont sensibles aux faibles vitesses indépendamment de la fréquence, les poils courts (< 500µm) sont activés pour des vitesses plus élevées et sont sensibles à la fréquence (Magal et al., 2006). Les grillons du premier stade sont toutefois capables de percevoir et de fuir un prédateur (Dangles et al., 2006b). Des expériences réalisées sur le terrain montrent que les performances de fuite diminuent au cours du développement, les grillons les plus jeunes répondant plus rapidement à un danger que les plus âgés (Dangles et al., 2007). Une forte variabilité dans la morphologie du système des cerques a également été observée entre plusieurs populations de *N. sylvestris*. Cette variabilité affecte à la fois la densité de poils filiformes ainsi que la longueur des poils. Ces deux paramètres ayant une forte influence sur la sensibilité, ils doivent fortement affecter la capacité à détecter les prédateurs (Dangles et al., 2005).

L'anatomie du système nerveux associé aux cerques a également été décrite en détail (Insausti el al., 2008). Sept paires d'interneurones possédant leurs corps cellulaires dans le TAG possèdent des axones d'un diamètre compris entre 20 et 45 µm et sont donc appelés interneurones géants (Fig. 9A) (Insausti et al., 2008). Chacun de ces IGNs a été nommé en fonction de son origine embryonnaire (comme cela a été fait pour les autres espèces). La figure 8B représente la position du corps cellulaire des 7 IGNs au sein du TAG. Chez *N. sylvestris*, à la différence de chez *A. domesticus*, certains neurones sensoriels se projettent sur l'hémiganglion contralatéral. Au niveau du glomérule cercal, les neuropiles sont compacts alors qu'ils paraissent peu organisés chez d'autres espèces de grillons, tels que, *A. domesticus* (Insausti et al., 2008).

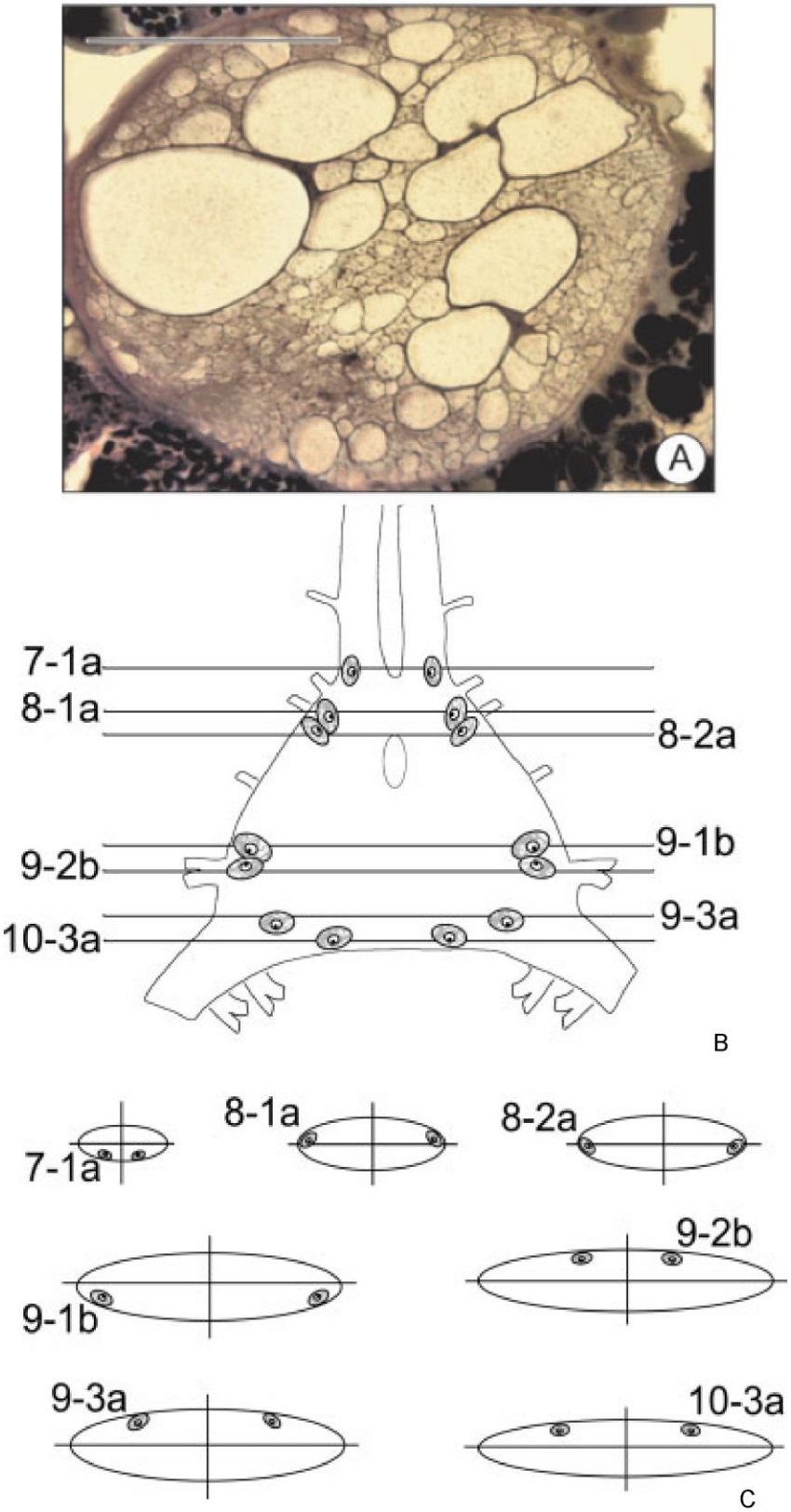

Figure 9 : (A) Section transversale d'un connectif de la chaine nerveuse ventrale, proche du TAG. LM. (B) Schéma du TAG et de la position des GINs reconstruit à partir de marquages au cobalt et de sections en série dans les trois plans de préparations à l'ethylgallate. Les GINs de *N. sylvestris* ont été nommés en suivant la nomenclature proposée par Jacobs et Murphey (1987), en leur attribuant le neuromère correspondant du 7ème au 10ème segment abdominal. D'après Insausti et al. (2008).

DEUXIEME PARTIE

Détection d’un objet en approche par le grillon des bois : bases sensorielles et comportement de fuite

Article 1

Detection of approaching objects by wood crickets: sensory basis and escape behaviour

Fabienne Dupuy, Jérôme Casas, Mélanie Body & Claudio R. Lazzari

In preparation

Abstract

The wind-sensitive cercal system of Orthopteroidea insects is one of the most elaborated systems for detecting the approach of a predator. The cercal system has been intensively analysed from a behavioural and neurobiological point of view, constituting at present a classical model system in neuroethology. Less is known, however, about their relevance in detecting an approaching object relative to other sensory systems. We have employed a piston for mimicking an attacking predator for quantitative evaluation of the escape behaviour of wood crickets to unravel the implication and performance of the cercal system. The movement of the piston not only generates air movement, but it can be seen and touch the insect, as a real predator does. Our results showed that 5 to 47% of crickets that detected the attack could not avoid to be touched. Crickets escaped attacks from behind better than attacks from the front, even though they evinced to detect the approaching object similarly in both cases. After cerci ablation 48% of crickets were still able to detect the approaching piston and 24% of crickets were able to escape successfully from the attack. So, cerci play a major role in attack detection but this residual capacity of detection after cerci ablation indicate that other mechanoreceptors or sensory modalities are implicated in this detection. Nevertheless, neither antennae nor eyes seem to be implicated in the attack detection as their inactivation did not reduce their detection and escape abilities.

Keywords : Escape behaviour, *Nemobius sylvestris*, cerci, sensory deprivation

Introduction

Escaping from predators is primordial for animal survival. Prey must be able to detect the predator early enough and to trigger behavioural strategies bringing them away from the danger. The wind-sensitive cercal system of Dictyopteran and Orthopteran insects (e.g., cockroaches, crickets, locusts) is one of the most elaborated systems for detecting an attacking predator (Camhi et al., 1978; Shimozawa et al., 2003). It is constituted by two antennae-like appendages located at the rear of the insects (i.e., the cerci), each bearing a high number of sensory structures, in particular, many filiform hairs, highly sensitive to air-movements (Shimozawa et al., 2003).

Since the years 70's, the function of the cerci of crickets and cockroaches, as well as neural elements carrying and processing mechanosensory information, have been extensively studied, becoming a classical model in neuro-ethology of sensory integration and behavioural guidance (Ritzmann, 1993; Jacobs et al., 2008).

Crickets possess the most elaborated cerci (Jacobs, 1995) and their cercal mechanosensory system is the most intensively analysed one. Studies on these insects focused on the neural basis of wind-detection (Murphey, 1981; Miller & Jacobs, 1984; Bacon & Murphey, 1984; Jacobs & Miller, 1985; Jacobs et al., 1986; Miller et al., 1991; Jacobs & Theunissen, 1996; Paydar et al., 1999; Jacobs & Theunissen, 2000; Yono & Shimozawa, 2008; Jacobs et al., 2008); on the escape behaviour (Gras & Hörner, 1992; Tauber & Camhi, 1995; Kanou et al., 1999; Schrader, 2000; Kanou et al., 2006); and on the plasticity and recovery after cercal ablation (Kanou et al., 1999; Kanou et al., 2001; Kanou et al., 2002; Kanou & Kondoh, 2004). Less is known, however, about their relative role in the detection of an attacking predator. This is due to the fact that relatively little work has been done for evaluating their relevance in the detection of approaching object relative to other sensory systems and also because most studies employed air-puffs directed to the cerci to stimulate them. Indeed the sensory basis of predator detection seems to be more complex than only the perception of air movements by the cerci. The eyes, the antennae and the mechanosensory hairs distributed over the insect's body may serve as sensors of potential inputs of attack-related information. This has been shown in cockroaches, where this behaviour involves the integration of multimodal sensory information such as antennal and visual (Comer & Dowd, 1993; Comer et al., 1994; Comer & Leung, 2004). Gnatzy and Heuβlein (1986) showed the implication of antennae and cerci in the triggering of kicking response in case of digger wasp

attack. They also showed that eyes were not involved. Nevertheless crickets can see targets and follow their displacement with antennae (Honneger, 1981).

The aim of our study was to evaluate the relative implication of cerci in the avoidance of an approaching object, simulating the attack of a predator.

In recent years, the wood-cricket, *Nemobius sylvestris*, started to be the subject of diverse studies focusing on prey-predator interactions, functional neuroanatomy, and modelling of the detection of a predator by the cercal sensory system (Dangles et al., 2005; Dangles et al., 2006a; Magal et al., 2006; Steinmann et al., 2006; Insausti et al., 2008). The main predator of this cricket species in the area of Tours (where studies were conducted) are wolf spiders *Pardosa sp.* (Dangles et al., 2006a), which aerodynamics of attack has been unravelled (Casas et al., 2008). This cricket represents thus a very interesting model system for the understanding of the sensory ecology of predator detection and the relative role of the cercal system.

Methods

Insect

Wood-crickets were caught in the forest around the city of Tours, France (47°23'N, 0°41'E) two months or less before the experiments. Crickets were maintained in plastic boxes (53 x 30 x 35 cm) at room temperature (between 17° and 25°C) and under natural light/dark cycles. Water and food (cat dry food) were provided *ad libitum*, supplemented from time to time with fresh fruits.

Experimental device

The experimental device (Fig. 10) used to analyze the escape behaviour was composed of a circular turning platform covered with white paper (Fig. 10A). A grey plastic cylinder (37 cm diameter and 20.2 cm of height) (Fig. 10B) placed around the platform allowed both to delimitate the experimental arena and to provide an homogeneous visual environment around the experimental individual. A transparent retention tube (2.8 cm diameter) (Fig. 10C) was used to keep the cricket in the centre of the arena. The tube was gently removed to release the cricket thanks to a plastic jointed arm (Fig. 10D).

Spider attacks were simulated using a PC-controlled electromagnetic piston 0.8 cm diameter (LAL35, Cedrat technologies, Meylan, France) (Fig. 10E). The velocity and the acceleration of the piston could be accurately controlled using a computer (for more details see Dangles et al., 2006b; 2007). Two light spots placed above the arena provide homogeneous illumination (white light, 11.7 µW/cm^2). Cricket behaviour was recorded using one or the other between two high-speed video cameras (500 fps, 1280x1024. Gigaview from Southern Vision Systems, Inc. (SVSi), Madison, Alabama) (113 f.s^{-1}, 128x128 pixels; DALSA).

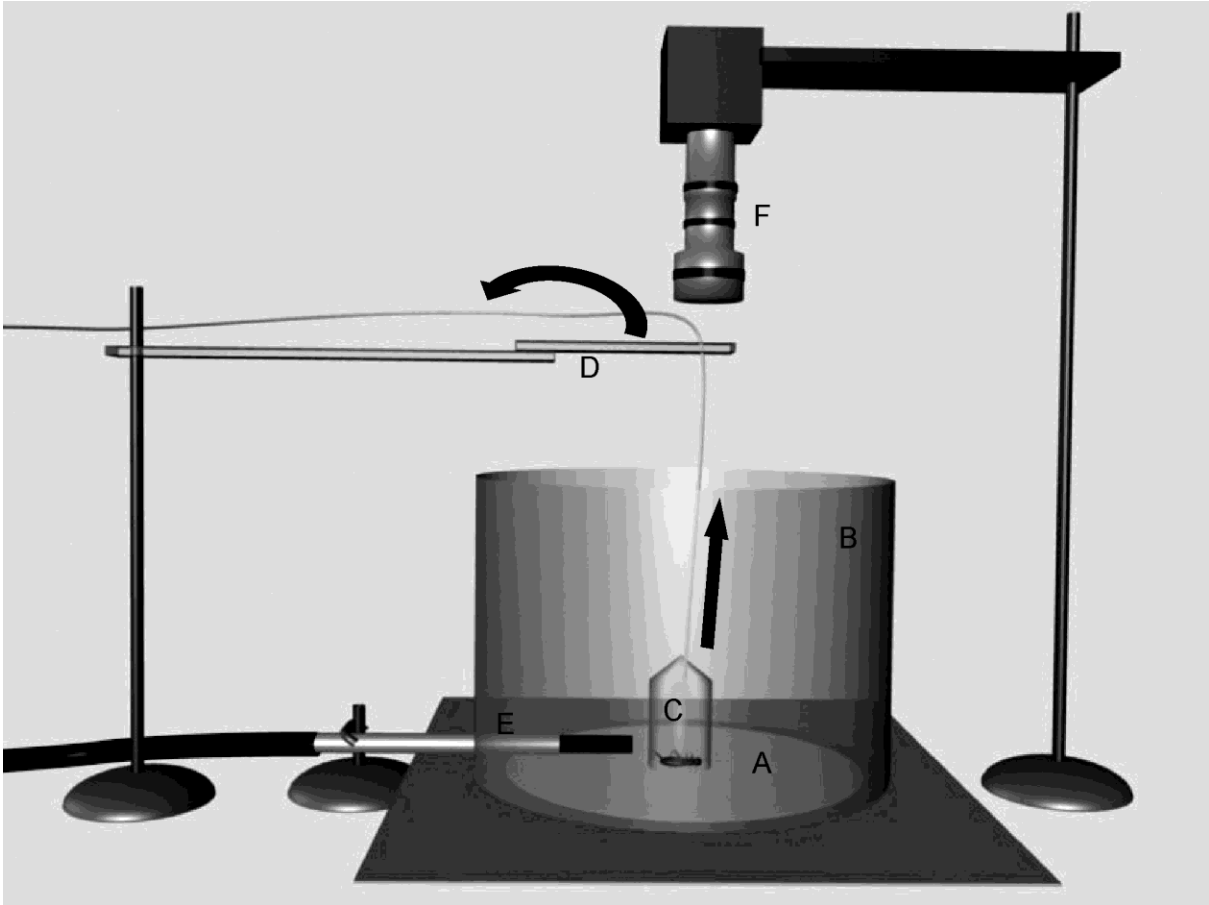

Figure 10 : Set-up used to study escape behaviour. A cricket was placed at the centre of the arena delimited by a cylinder (B). The base of the arena was a rotating area (A) allowing to orientate the cricket according to the position of the piston (E). When the cricket was motionless, the tube (C) was removed gently thanks to an articulated arm (D). Using the articulated arm allowed to avoid generating air movement. If the cricket stayed immobile after the removing of the tube, the piston was activated and the cricket behaviour was recorded thanks to the high speed video camera (F).

For stimulation, the piston was introduced into the arena through a hole at the base of the cylinder forming the arena wall. The piston was placed at a distance of around 4 cm from the cricket and moved at 25 cm/s over a distance of 4.5 cm. If a cricket did not escape, it was reached by the piston. In each trial, a cricket was placed at the centre of the arena, immobilized by the retention tube and then oriented according to the direction of the piston by rotating the platform. The tube was removed only when the cricket did not move anymore and the piston launched only if the insect remained immobile.

Experiment 1: the characterization of escape behaviour

Crickets were stimulated from three directions: from the front (0°), from the side (90° or 270°) and from behind (180° according to the cricket), as represented in Fig. 11.
Three groups of crickets were used: J1, composed by juveniles of instars 1 to 3 (posterior femur length < 2.24 mm, Campan, 1965) (0°, N=22; 90°, N=8; 270°, N=13; 180°, N=22); J2, juveniles of instars 7 to 9 (posterior femur length > 3.85 mm, Campan, 1965) (0°, N=20; 270°, N=20; 180°, N=21); and A, adults (0°, N=22; 270°, N=21;180°, N=19).

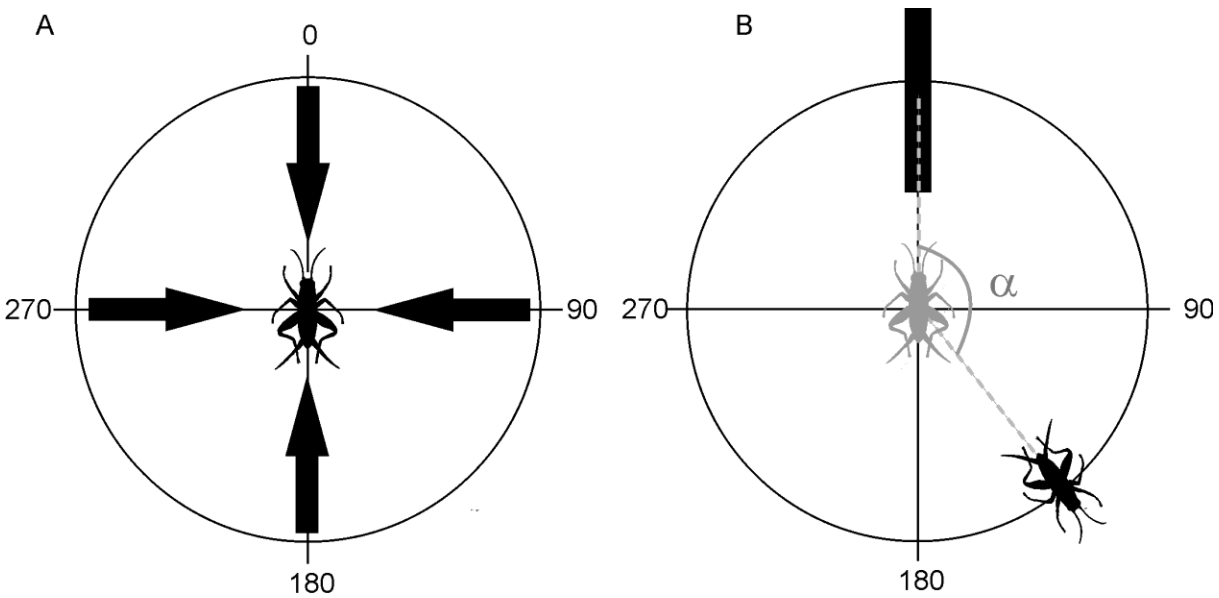

Figure 11 : (A) Stimulation angles. According to the position of the cricket, it was stimulated at 0° (from the front), 270° (from the side) and 180° (from behind). (B) Escape angles correspond to the angle formed by the initial position of the cricket (at the beginning of the experience) (grey cricket) as related to the piston longitudinal axis and the position of the cricket after escaping (black cricket).

Experiment 2: the implication of sensory organs

Four different treatments were applied to crickets of instars 1 to 4.

- *Intact*
- *Ablated antennae* (crickets were anesthetized by exposition to CO_2 during 30 seconds, the antennae were cut and dental wax of low melting temperature was applied to seal the wound; ablations were performed at least 15 hours before experiments).
- *Ablated cerci* (same procedure as before)
- *Covered eyes* (crickets were anesthetized with CO_2, and their compound eyes covered by black acrylic paint at least 15 hours before experiments).

A fifth group of crickets:

- *Addition of visual cues:* a black square of 10 x 10 cm was added to the arena wall at 90° to the right or to the left from the cricket. Only intact crickets were used in this experiment.

Video and data analyses

Two different behavioural responses were quantified:

1- "attack detection"; i.e. any movement of the cricket occurring before the insect was touched by the piston,
2- "successful escape", i.e. any evasive manoeuvre avoiding the contact of the piston.

The escape direction was also measured as the angle formed by the centre of the cricket's body and the piston at the beginning of the experience and the position of the centre of the body after escaping by using MB Ruler 3.3 software (Markus Bader – MB-Software solutions) (Fig. 11B). Arbitrarily, we considered the piston being at 0° and the centre of the cricket's body before stimulation as the rotation axis. Finally the escape mode (jump, run, turn) and active movement of the antennae were noted for crickets that escaped successfully.

Statistical analyses

Detection and escape success rates were compared using the binomial test (Hollander & Wolfe, 1973). In case of multiple comparisons, the Bonferonni correction was applied. The escape direction angle was compared to the predicted direction using V test (Zar 2009).

Results

Two types of response were analysed i.e. attack detection and successful escape. These responses were studied on 3 groups of crickets: J1 (instars 1 to 3), J2 (instars 7 to 9) and A (adults). Different directions of stimulations were presented to the cricket (from the front, from the side and from behind). In this case, ahead the cricket the angle is considered as 0°, from behind 180° and from the side 90°.

Escape behaviour along development

Figure 12 depicts the frequency of the two types of response analysed for the different age groups vis-à-vis the piston coming from the different directions

Crickets reacted stronger to the approaching piston, when it came from behind or from the side than when it approached from the front (Table 1). In general, crickets showed better detection and escape success for an attack from behind and from the side than when coming from the front.

In addition, J1 performed better than J2 and A crickets (Table 2). The successful escape rate of J1 crickets was significantly better than that of A crickets for an attack from behind or from the front. The successful escape rate of J2 was significantly higher than that of A crickets for an attack from the front. No difference was observed for other directions of stimulation or other groups.

The distance between the tip of the cerci and the piston was measured when the cricket started moving, and only for crickets that detected the piston movement coming from behind. No significant difference was observed between J1 (detection at 8.5 ± 3.2 mm, mean ± S.E.M.), J2 (6.9 ± 3.8 mm) and A (8.3 ± 5.4 mm).

Crickets escaped by jumping or walking and, depending on the piston direction they turned before escaping (0° and 90°) or did not (180°, Table 3). For a piston approaching from the front or from the side, most crickets that succeeded in escaping first turned and then either jumped or walked.

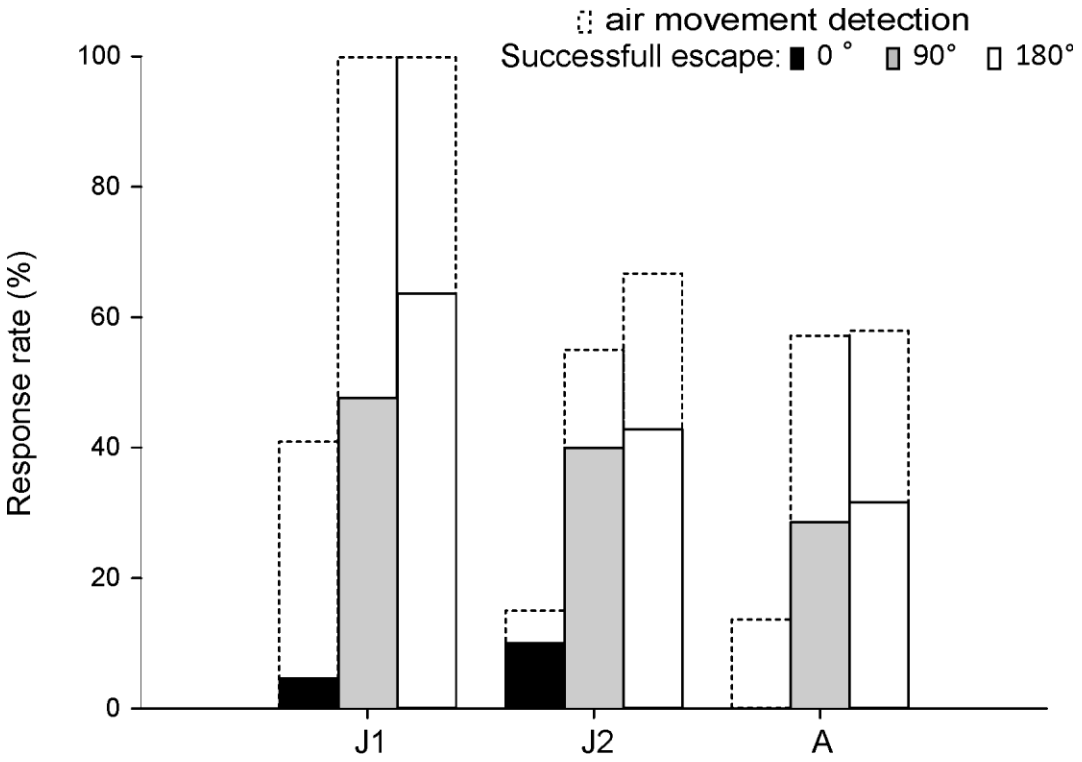

Figure 12 : Responses rates for the three groups of different developmental level J1 (1st to 3rd instars; N=65) J2 (7th to 9th instars; N=61) and A (adults; N=62) and the three directions of stimulation 0° (in black), 90° (in grey) and 180° (in white). Rates of two responses are represented, the detection of the stimulation (dashed lines) and the successful escape (full bars).

		Detection	Successful escape
0° vs 180°	J1	P<0.001	P<0.001
	J2	P<0.001	P<0.001
	A	P<0.001	P<0.001
0° vs 90°	J1	P<0.001	P<0.001
	J2	P<0.001	P<0.01
	A	P<0.001	P<0.01
180° vs 90°	J1	P=NS	P=NS
	J2	P=NS	P=NS
	A	P=NS	P=NS

Table 1 : Results of the statistical analysis (binomial tests) for comparisons between directions of stimulation (according to cricket). As multiple comparisons were done, Bonferoni correction was applied and differences were considered as significant for a P<0.016 (α/3) and NS corresponds to P>0.016 (α/3).

		Detection	Successful escape
J1 vs J2	0°	P<0.01	P=NS
	90°	P<0.001	P=NS
	180°	P<0.001	P=NS
J1 vs A	0°	P<0.01	P<0.001
	90°	P<0.001	P=NS
	180°	P<0.001	P<0.01
J2 vs A	0°	P=NS	P<0.001
	90°	P=NS	P=NS
	180°	P=NS	P=NS

Table 2 : Results of the statistical analysis (binomial tests) for comparisons between cricket instars. As multiple comparisons were done, Bonferoni correction was applied and differences were considered as significant for a P<0.016 (α/3).

		Turn			No turn		
		0°	90°	180°	0°	90°	180°
J1	Turn	0	0	0	0	0	0
	Jump	100	70	7.14	0	10	85.71
	Walk	0	10	0	0	10	7.14
J2	Turn	50	12.5	0	0	0	0
	Jump	50	75	0	0	0	77.77
	Walk	0	12.5	0	0	0	22.22
A	Turn	0	33.33	0	0	0	0
	Jump	0	50	0	0	0	33.33
	Walk	0	16.66	0	0	0	66.66

Table 3 : Escape behaviour of the three groups of different developmental levels for the different directions of stimulation. The escape is often constituted of a succession of different actions. Columns refer to the turn action and rows to the escape action. Percentages of crickets performing the action were indicated in the corresponding box.

As younger crickets showed better performances than older ones particularly for detection, and because younger crickets seem to be more predated by spiders (Dangles et al., 2006a) the subsequent analysis were conducted on J1 crickets.

Escape performance

The proportion of crickets that perceived the approaching piston before it reached them was higher than the proportion of crickets that successfully escaped (for J1, 180°: $P<0.001$; 90°: $P<0.001$; 0°: $P<0.001$). Around 40% of J1 perceived the approaching piston but didn't succeed in escaping (Fig. 12), being consequently touched by the piston.

Escape direction

We also analysed the escape behaviour of J1 as a function of the attack direction. Only the escape direction of crickets which escaped successfully was taken into account in the

analysis. Low proportion of crickets succeeded in escaping from an attack from the front (1/22). Crickets mostly escaped in the direction opposite to the approach of the piston, but with a wide range of values (Fig. 13). For an attack from behind crickets escaped at 169 ± 6.6° (mean ± S.E.M.) according to the piston position and for an attack from the side they escape at 156 ± 12° (mean ± S.E.M.) according to the piston position. So, crickets escape away from the stimulus in an opposite direction (V test, theoretic angle = 180°: V = 0.912, P<0.001 from behind and V = 3.467, P<0.001 from the side). No difference was observed in the escape direction for stimulation from the back and from the side (Watson-Williams F test: $F_{1,22}$ = 1.324, P = NS).

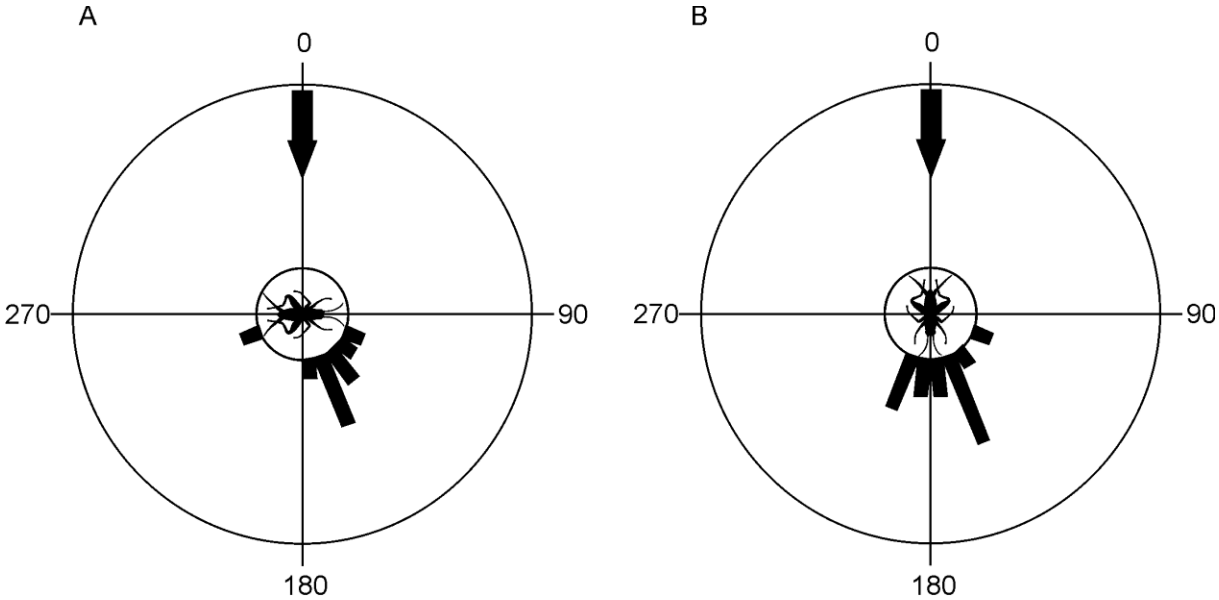

Figure 13 : Distribution of escape angles of J1 crickets. Black arrows represent the stimulation direction which is 0° since angles were measured according to the longitudinal axis of the piston. External circle correspond to N=10. (A) Results for a stimulation from the side. (B) Results for a stimulation from behind.

Involvement of the different sensory organs in the escape

1. *Mechanoreception*

We conducted ablation experiments to unravel the contribution of the cerci and other organs in the detection of air movement and escape behaviour. Either the antennae or the cerci were cut to eliminate sensory inputs from these organs, and we evaluated the performance of crickets vis-à-vis attacks from the front (0°) and from behind (180°).

Detection rate and successful escape were significantly lower for cerci ablated crickets than for intact crickets for attacks coming from both directions (Fig. 14). Nevertheless 48% of

the crickets were still able to detect the approaching piston and 24% were able to escape successfully from an attack from back (Fig. 14).

Crickets lacking antennae obtained comparable detection and successful escape rates than intact crickets, given an attack from back (Fig. 14). For an attack from the front, ablated antennae crickets showed significantly better detection rate than intact crickets and no difference in successful escape rate was found between these two groups. For an attack from the front a majority of intact crickets were touched by the piston at their long antennae, something that is not possible in insects without antennae. Thus, they had more time to escape before to be touched at their head (or other part of the body in case they started turning). Moreover crickets tend to move actively their antennae in direction to the moving object (Honegger, 1981). This behaviour was observed in 18% of the crickets for an attack from the front and in 27% of the crickets for an attack from behind. The increase of the detection rate could be due to the fact that crickets were touched in their antennae and not to a real increase in the detection capabilities in absence of the antenna. To test it we analysed again the responses of intact crickets considering a cricket detected the stimulation when it moved, before to be touched somewhere on its body, except its antennae. In this case 69% of the crickets detected the piston. This rate is not different from the detection rate of the ablated antennae crickets. Most crickets were touched at the level of their long antennae for an attack from the front. It is so difficult in presence of antennae to evaluate the ability of crickets to detect piston approaching from the front. To evaluate this ability we compared detection rates between intact crickets for an attack from behind and antennae ablated crickets for an attack from the front. We did not observe difference between these groups, the detection ability of crickets was similar for stimulation from the front and from behind.

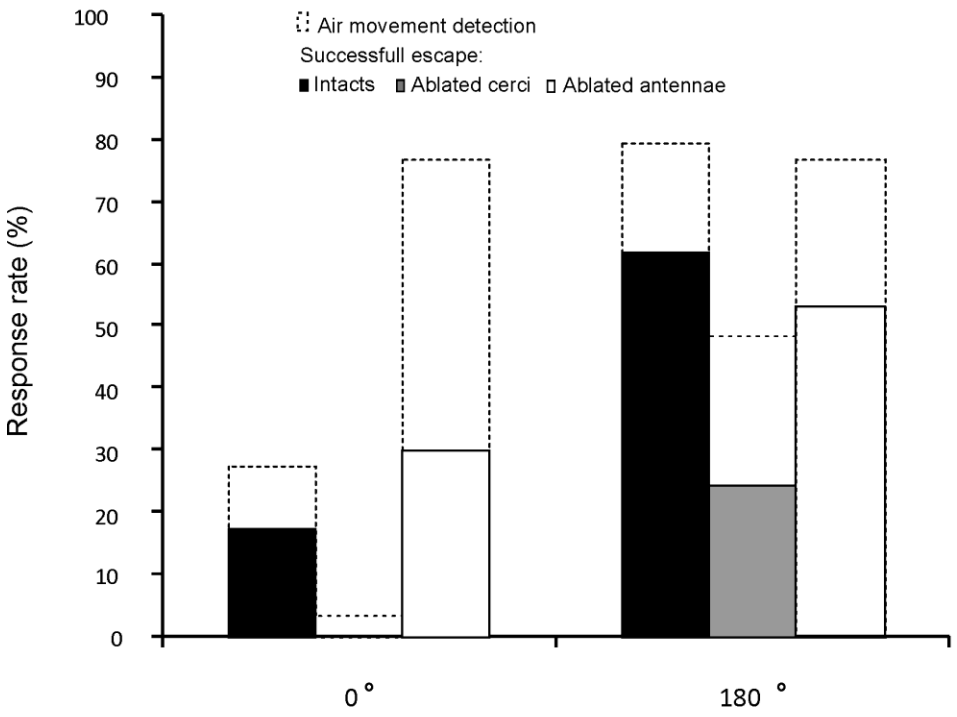

Figure 14 : Responses rates for the two directions of stimulation 0 and 180° and for intact crickets (black bars), ablated cerci crickets (grey bars) and ablated antennae crickets (white bars). Rates of detection of the stimulation (dashed lines) and of the successful escape (full bars) are represented.

	Detection	**Successful escape**
Intacts vs ablated cerci	0°: P<0.01 180°: P<0.001	0°: P<0.01 180°: P<0.001
Intacts vs ablated antennae	0°: P<0.001 180°: P=NS	0°: P=NS 180°: P=NS
Ablated cerci vs ablated antennae	0°: P<0.001 180°: P<0.01	0°: P<0.001 180°: P<0.01
Intacts 180° vs ablated antennae 0°	P=NS	P<0.001

Table 4 : Results of the statistical analysis (binomial tests) for comparisons between different groups of crickets. As multiple comparisons were done, Bonferoni correction was applied and difference were considered as significant for a P<0.0125 (α/4).

2. Vision

Crickets with covered eyes showed a significant decrease in the detection rate as compared to intact crickets for an attack from the front and also from behind (Fig. 15) (binomial test: attack from 0°: P<0.01; P<0.01 respectively) (Table 5). No effect of the elimination of visual inputs was observed on the successful escape rate for both directions of stimulation.

No effect of the presence of visual landmarks on the direction of escape was observed, cricket always escaping at 180° from the stimulus (V-test: u=5.454, P<0.001) (Fig. 16).

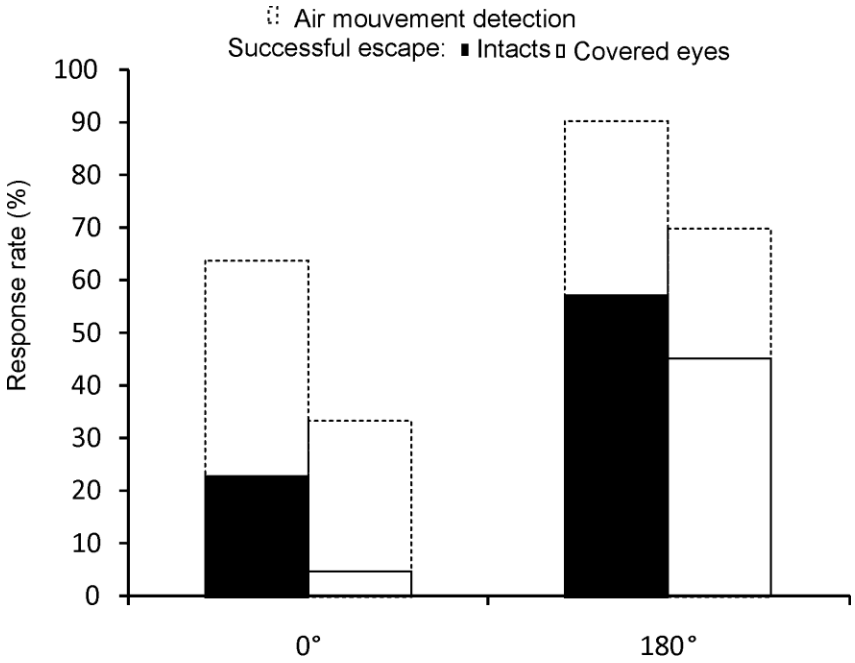

Figure 15 : Responses rates for two directions of stimulation 0 and 180°, for intact crickets (black bars), covered eyes crickets (white bars) and crickets with visual information condition (white bars). Rates of two responses are represented, the detection of the stimulation (dashed lines) and the successful escape (full bars).

	Detection	Successful escape
Control vs covered eyes	0° : P<0.01	0° : P=NS
	180° : P<0.01	180° : P=NS

Table 5 : Results of the statistical analysis (binomial tests) for comparisons between differents groups of crickets.

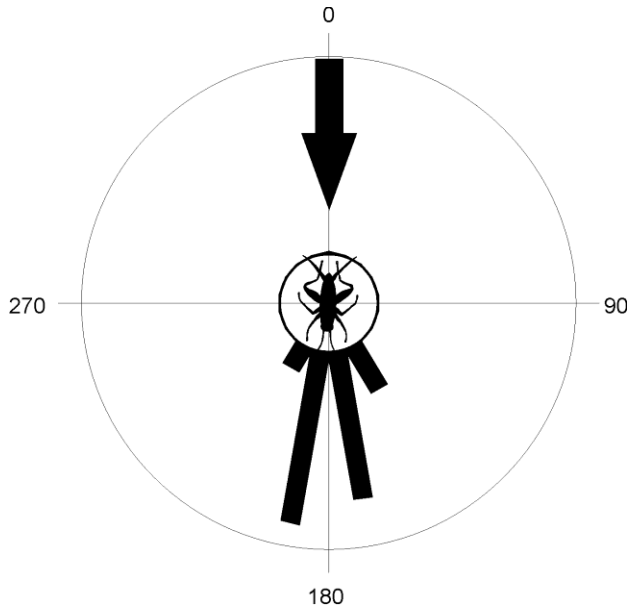

Figure 16 : Distribution of escape angles of J1 crickets in presence of visual information (e.i. black square) in the visual field of the cricket. External circle correspond to N=8.

Discussion

To escape from the attack of a predator, animals should be able, first, to detect the approaching danger as soon as possible and, second, to trigger the most appropriate motor pattern in terms of velocity and directionality.

In our experiments, we evaluated the detection of the approaching object and the escape performance of crickets using the following criteria: 1) the number of crickets moving during the approach of the piston (i.e. before any contact) and 2) the number of crickets that escape avoiding to be touched by the piston (successful escape). Thus, by using the piston, it was possible to distinguish the movement of the insect evoked by the detection of an

approaching object and the performance of crickets at escaping. Moreover piston constitutes a visible object like predators. Most previous studies on the escape behaviour of crickets have been conducted stimulating the crickets by means of air puffs. This type of stimulation, although easily controllable, does neither allow multi-step quantification of the success of the escape, nor evaluation of the relative role of cerci in the detection.

We found that the escape probability was always lower than the probability of detecting the approaching object, and this, for all group of cricket and for all stimulation directions. Indeed, the detection of an attack was not always followed by successful escape and 5 to 47% of crickets that detected the attack were touched by the piston. After cerci ablation 48% of crickets were still able to detect the approaching piston and 24% of crickets were able to escape before being touched. Nevertheless neither antennae nor eyes seem to be implicated in the attack detection as their inactivation didn't reduce their detection abilities.

Escape performance of Nemobius sylvestris

As shown by table 6 the ability for detecting an attack was in our experiment higher than that observed in *Gryllus bimaculatus*, or on *Gryllodes sigillatus*. Our study was conducted using a piston approaching at 25 cm/s, a speed that seems to evoke the highest escape response of *N. sylvestris* (Dangles et al., 2006c). The air-speed stimulating the cerci was probably lower, since air-speed decreases with the distance to the piston (Casas et al., 2008) and crickets reacted before being touched. In other species, the air-speed employed to stimulate escape with air-puffs was much higher. For instance, the response level for a stimulation of 300 cm/s (air speed) was higher than the response level for a stimulation of 90 cm/s in *G. bimaculatus* and in *G. sigillatus* (Kanou et al., 1999; Kanou et al., 2006). These velocities appear as too high compared to that generated by an approaching predator (Magal et al., 2006; Casas et al., 2008).

	Our experiments	**Kanou et al., 1999**	**Kanou et al., 2006**
Insects	*Nemobius sylvestris*	*Gryllus bimaculatus*	*Gryllodes sigillatus*
Stimulus	Moving piston	air puff	air puff
Ontogeny	Young crickets present better results than adults	experiments done on adults	experiments done on adults
Detection rate for 25cm/sec	42% for adults 77% for juveniles		
Detection rate for 90 cm/sec		1.3%	10%
Detection rate for 300cm/sec		51.3%	80%

Table 6 : Experimental results and conditions of 3 different studies.

The change in the performance along the development

J1 crickets showed a better detection performance than adult crickets in our experiments. This decrease in the detection ability along the crickets life was previously observed in similar experiments conducted in the field (Dangles et al., 2007). It was also observed in experiments in which crickets had to escape from wasp attacks that larvae reacted faster than adults (Gnatzy & Heuβlein, 1986).

Under controlled conditions 100% of J1 detected the approaching piston, whereas in the field only 32.1% did it (Dangles et al., 2007). This difference could be ascribed to the structural complexity of the natural habitat of *N. sylvestris* and to wind, which could reduce the detection ability of crickets. In addition, provided that the same ontogenetic variation in the performance was observed in the laboratory and in the field, we can speculate that natural noise would affect equally crickets of different instars. Nevertheless, the global performance was lower in the field than in the laboratory.

Implication of the different sensory organs

Cerci ablation experiments evinced the essential role played by these organs, provided that the rate of detection fell drastically in their absence. They also however revealed that cerci are not the sole organs involved in the detection of approaching objects in crickets. Indeed, in the absence of cerci, 48% of crickets still detected the piston movement and 24% escaped successfully. Residual capacity of detection after cerci ablation was also observed in *G. bimaculatus* (Kanou et al., 1999) and *G. sigillatus* (Kanou et al., 2006). Thus, crickets could perceive attacks by mechanoreceptors located on other parts of their body (filiform hairs are distributed over almost the whole body surface and particularly on antennae), or by using other sensory modalities. We have partially analyzed the contribution of the visual and antennal inputs. Surprisingly ablation of antennae didn't affect detection performances, even for stimulation from the front. It has been suggested for cockroaches that the "appropriate stimulus" for the antennae is probably touch, rather than wind (Stierle et al., 1994).

Attack detection was affected by the suppression of visual inputs, for stimulation from the front and from behind. No effect on the rate of escape was observed. Provided that our measures of the visual field of *N. sylvestris* revealed that it does not extend enough to the rear to be able of seeing objects placed behind the insect, the decrease in the detection ability observed in crickets with covered eyes could be induced by a general decrease of the general activity (kinetic effect) in the absence of light.

Previous field observations suggested that *N. sylvestris* orientated their escape towards trees or other targets (Campan & Gautier ,1975; Beugnon et al., 1983; Lambin, 1985). Nevertheless, in our experiments under controlled conditions, the presence of a contrasting object in the cricket's visual field (a black square) did not affect the escape direction.

Concerning the direction of the attack, our results on intact crickets showed detection performances significantly higher for stimulation from behind than from the front. After ablation of antennae or no taking into account their presence (i.e. notwithstanding if they were touched) on intact crickets, no difference was observed between stimulation from the front or from behind concerning the ability to detect the approaching piston. However, differences were still present concerning the escape rate, i.e., significantly more crickets escaped successfully when stimulated from behind than from the front. The poor ability to escape from a frontal attack could be explained by the fact that crickets turn before escaping, adding a supplementary delay as compared to just jumping. *T. neglectus* crickets use a different

sequence of movements to escape; they jump turning on the air away from the stimulus (Schrader, 2000), which could constitute a better strategy to quickly put some distance from objects approaching from any direction. It is interesting to note that detection performance is as good for an attack from behind as for an attack from the front, supporting the idea that the poor performance observed when the object approach from the front is more related to motor constraints rather than to sensory inability to detect it.

Ecological implications

As explained before, spiders are the main predators of *Nemobius sylvestris* in the geographical area of this study. As we have shown, the ability of crickets to escape from an approaching object is strongly affected by the direction of approach. No data is at present available concerning the directionality of spiders' attack when trying to capture a cricket. Given the arms race usually established in evolutionary terms between predator and prey, it is possible that spiders had adapted their attacking strategy to exploit the low performance of crickets when attacked from certain directions, to increase their chances to succeed. Future work should focus on real attacks, in order to fully understand the actual functionality and performance of the sophisticated sensory system associated to the insect cerci.

Acknowledgments: This work received financial support from the European Community (Customized Intelligent Life Inspired Arrays, CILIA project; Contract grant number: FP6-IST-016039), the CNRS and the University of Tours (France). We thank Baptiste Tessier and Marie-Anne Wycke for their participation in the experiments.

TROISIEME PARTIE

Perception mécanosensorielle en milieu bruité

Article 2

Mechanosensorial perception in noisy environments

In preparation

Introduction

The background noise is nearly always present in natural environments. The noise is usually viewed as detrimental to signal detection. Sensorial systems must extract relevant information from all stimuli reaching it. This is particularly true in the case of the cercal system of crickets, which is a mechanosensory system allowing them to perceive air movements (Gras and Hörner, 1992), particularly those generated by an attacking predator (Gnatzy and Hustert, 1989). Indeed, many sources of air movement are present in the natural environment of crickets. Some air movements are variable, powerful and complex like the wind (atmospheric phenomenon). Others air movements are less variable but presenting parameters potentially close to the attack of a predator, like displacements of other crickets. Finally others are predictable, like air movements generated by the own displacement or cerci movements (Edwards and Palka, 1974). All these air currents can also be modified by the structural properties of the environment. Nevertheless, crickets are able to detect the low air movement generated by an attacking predator in the presence of this very complex and variable background noise. The ability of the cercal system to detect approaching predators under noisy conditions has not been much studied. Provided that these experiments were conducted using white noise in the laboratory, and that natural noises can be more complex, field experiments could shed more light on the way the cercal system works under natural conditions.

In this study we recorded the nervous activity ascending from the terminal abdominal ganglion (TAG) of wood crickets under both laboratory and field conditions in order to analyse the effect of background noise on the detection of an approaching object.

The wood cricket *Nemobius sylvestris* is, since several years ago, the subject of studies focusing on the ecology (Dangles et al., 2006a), the neuroanatomy of the cercal sensory system (Insausti et al., 2008), the anatomy of cerci (Dangles et al., 2005), mathematical modelling of the movement of mechanoreceptive hairs (Magal et al., 2006) and air movements around hairs on cerci (Steinmann et al., 2006). *N. sylvestris* crickets live in the litter of forests, an easily accessible environment for field experiments. The main predator of this cricket species is the wolf spider *Pardosa sp.* (Dangles et al., 2006a), which attack aerodynamics has been described (Casas et al., 2008) and can be simulated using a mechanical device (Dangles et al., 2006b).

The aim of this work is to study the information carried by the connectives from the TAG to higher nervous centres, analyse the coding of some parameter of the sensorial stimuli (which are close to natural stimuli) and investigate whether noisy environment affect this information and how.

Material and methods

Insects

Juveniles of *N. sylvestris* belonging to instars 7 to 9 (posterior femur size superior to 3.85mm; Campan, 1965) were used in these experiments. Crickets were captured in the forest of the surroundings of the city of Tours (47°20’07’’N, 0°45’10’’E), France, during the summer 2007 and maintained in plastic boxes (53 x 30 x 35 cm) at room temperature (between 17° and 25° C) and under natural light/dark cycles. Water and food (cat dry food) were provided *ad libitum*, supplemented from time to time with fresh fruits. Only crickets with intact cerci were used in these experiments.

Recording set-up

Silver wire electrodes (25 µm diameter), insulated except at the endings were used. One end of the recording electrode was bent to a hook. The recording electrode was connected to a pre-amplifier (x10) followed by an amplifier associated to an A/D converter (x 10 IDAC02, Intelligent Data Acquisition Controller, Syntech, Netherlands), used in AC mode. Data were collected using Autospike software (Syntech) and analysed using MIEN software (Model Interaction Environment for Neuroscience, Graham Cummins) and custom-made Matlab® routines.

The set-up established for laboratory and field experiments is schematized in the figure 17. Experiments were filmed using a CMOS RDT/16 high-speed video camera using a f2.8/28-75 mm lens producing a field of view of 8 x 8 cm around the cricket (DR'S DATA & IMAGING SYSTEMS, Oakland, NJ 07436, USA). Recordings were done at 800 frames per second, 1024 x 624 pixels resolution. Video data were acquired using MIDAS 2 software (Xcitex Inc., Cambridge, MA 02141, USA). A pre-triggered recording mode was used, which allowed recording between 110 and 875 ms before stimulation. High-speed video recordings revealed the occurrence of a delay between the triggering pulse and the actual displacement of

the piston. This delay was 5 ms when the piston was used alone (i.e. without extension), and 16 ms using the extension. These delays were taken into account in the analysis of the data.

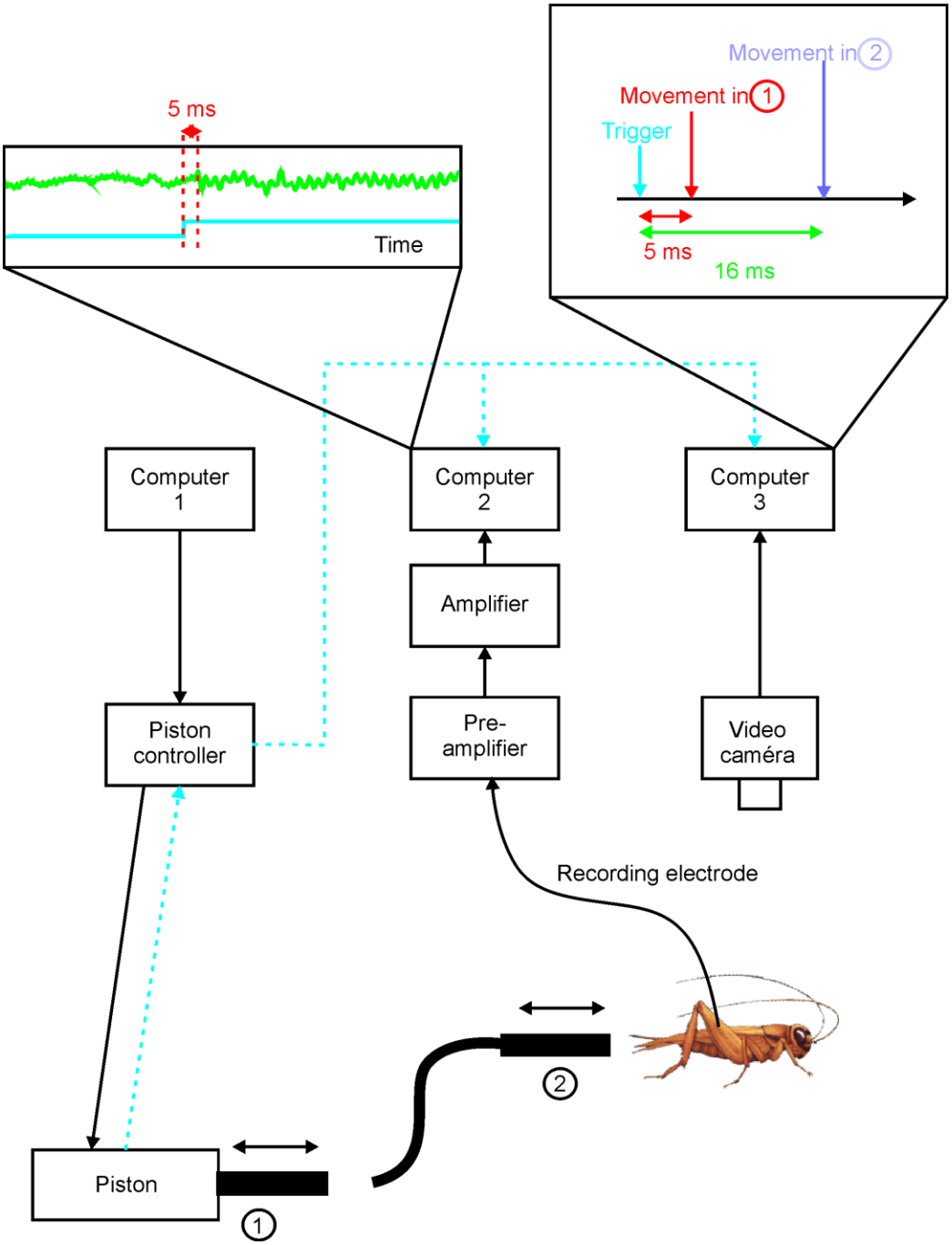

Figure 17 : Diagram of the set-up for behavioural and electrophysiological experiments. Dotted blue lines represent the triggering signal. In the laboratory, electrophysiological recordings were done on restrained crickets and the piston was used without the extension (1). In field recordings, the insects remained free and the piston extension allowed the correct positioning of the piston (2). Left insert shows the delay measured in electrophysiological data. The blue line corresponds to trigger values. The green curve corresponds to the electrophysiological recording. Right insert is diagram representation of delays measured in the video recordings between the video trigger and the movement of the piston without and with the extension.

Insect preparation

The cricket was placed under a CO_2 loaded atmosphere during 30 seconds. It was then fixed on a glass strip, ventral side up (Fig. 18), using dental wax melting at low-temperature. Only hind legs and a small area of the abdomen were fixed to allow releasing the cricket easily and without injuries after the placement of electrodes. The cuticle was opened at the level of the 7th sternite. The fat tissue was removed to expose connectives between the last and the 7th ganglion. The recording electrode (Fig. 18 Ee) was put in place, around the connective, using a micromanipulator. The window opened in the cuticle was covered with a piece of Parafilm® fixed with dental wax. The wax was also used to fix the electrode to the abdomen. The reference electrode was introduced in a small aperture made in the thorax between middle and hind legs. A drop of dental wax was used to fix the electrode and to close the aperture. Wires were fixed with wax at several points of the ventral and the dorsal abdomen. The cricket was then ready to walk freely in field experiments (Fig. 18 C).

Procedure

Three stimulation runs, using 6 different piston velocities (5, 11, 15, 25, 40 and 50 cm/s) were applied to each cricket (6 crickets in the laboratory and 11 crickets in the field) in a random sequence. Electrophysiological recordings were conducted under both, laboratory controlled and field natural conditions.

In the laboratory, the cricket was kept fixed to the glass strip in order to reduce air movements that could stimulate the cerci. The piston (without extension), was used to stimulate crickets. It was placed at 5.2 cm away from the tip of cerci and kept at 3 mm from the floor, corresponding more or less to the height of a spider body.

In the field, freely moving crickets were used. An extension cable was added to the piston, in order to allow a better handling. Indeed a constant positioning of the piston at a good distance from the cricket was manually done by the experimenter. We video-recorded the experiments in order to get the exact position of the piston and the movement of crickets.

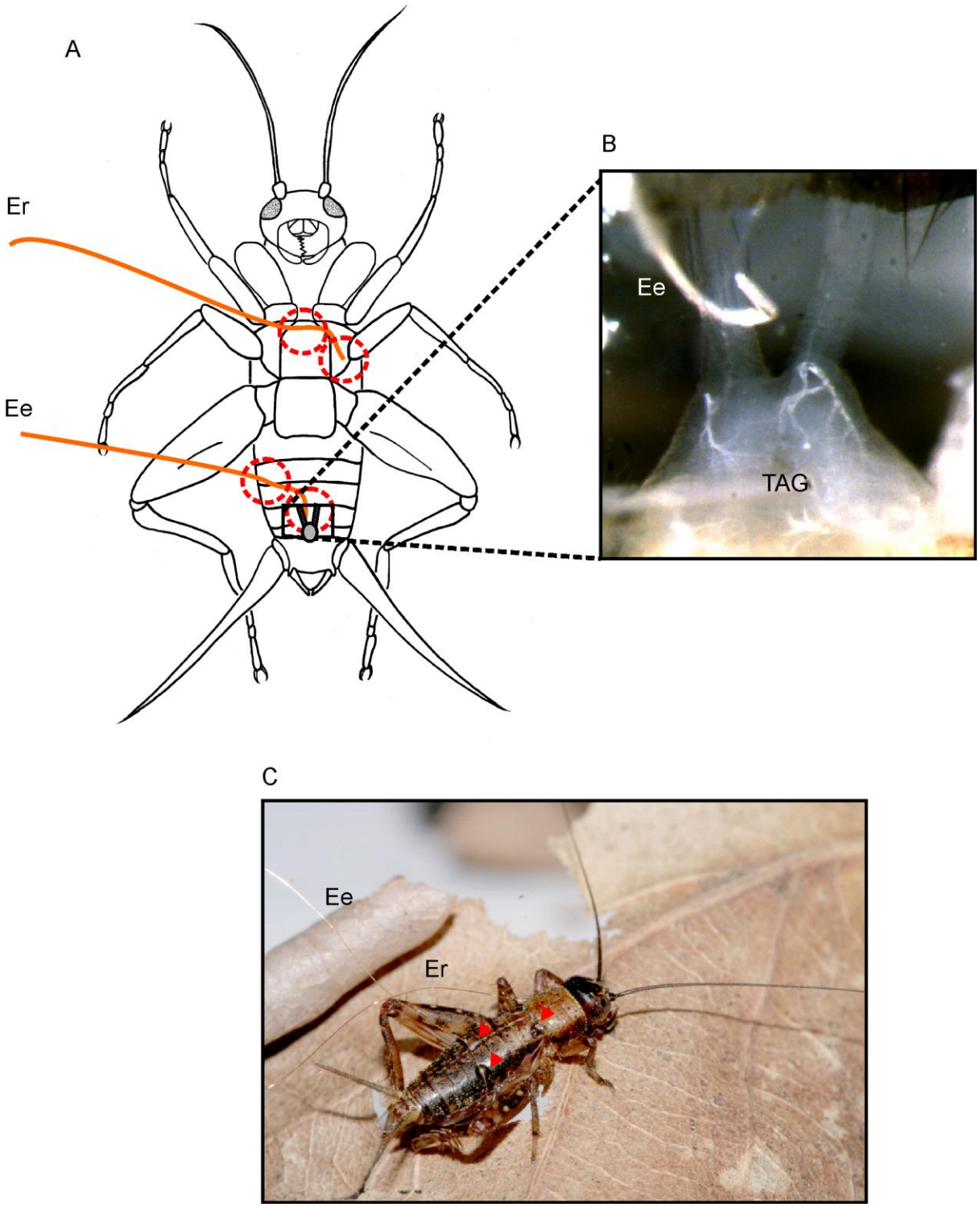

Figure 18: Insect preparation: (A) two electrodes are placed in the insect body, one of reference (Er) and the other for recording (Ee). Electrodes were fixed with dental wax at several points of the body, represented by dotted red circles. (B) The hook-shaped Ee electrode was placed and bent around one connective just before the TAG. (C) Both electrodes were fixed with the dental wax to the dorsal side of the thorax and the abdomen, allowing the cricket to move freely.

Data analysis

Most of analysis was done using the MIEN software (Model interaction environment for neuroscience. Graham Cummins). Only negative values of the signal were used for analysis (Fig. 19A), being more reliable as it corresponds, in extracellular recording, to the depolarization of the membrane (Hubbard et al., 1969). Electrophysiological data were first filtered using high pass filters of 500 to 1500 Hz (several repetitions with increasing frequency as long as the spike's form and amplitude kept constant; Cummins, personal communication). After filtering the data, the sinusoidal electrical radiative noise created by the actuation of the piston (Fig. 17 left insert) was removed by subtracting a sinusoidal function of the same amplitude and frequency (about 2 kHz). This processing operation increased signal-to-noise ratio from about 2 for the raw data to 10. A threshold just above the noise was used to extract spikes. The negative part of spikes was used to separate units. To compensate for the low sampling rate (20833 Hz), the spike minimum value was calculated using interpolation methods (Fig. 19B red arrow). The distribution of spike minima shows several distinct clusters (Fig. 19C blue bars). The statistical cluster analysis was performed on minimum distributions using MIXMOD 2.1.1 (Mixture modelling software from Biernacki et al., 2006). Several clusters were obtained for each recording (Fig. 19C red curves). Curves representing clusters were compared and modified applying translation and scale modification to obtain good match between clusters (Fig. 19D). Translations (t) and scale modifications (s) were applied to values of voltage recorded as $V_{new}=V_{recorded} \times s + t$. These modifications of data allow to free oneself of the variation of conditions (e.g. connective isolation, gain of amplifier) during recordings. Same thresholds were used for all recordings. Using clusters analysis six different clusters were identified in the recording used as the model (Fig. 19C and E). These clusters correspond to six units of different minimum amplitudes. Unit 1 corresponds to spikes of small amplitude. Amplitude increases from unit 1 to 6 and the unit 6 shows the biggest spike amplitude. To identify units on other recordings, six thresholds were used (Fig. 19E). The rate of response corresponding to the number of spikes per seconds was measured during sensory stimulation, i.e. during piston movements (called stimulus) and during a moment where no sensorial stimulation was applied (called control) in the laboratory and in the field. These rates of response correspond to the number of spikes of the unit occurring during a period of time divided by the duration of the period of time. The period of time corresponds to the moment of the sensory stimulation for recordings in which stimulus

were applied. It corresponds to a moment before the sensory stimulation and of the same duration as the sensory stimulation for the group control.

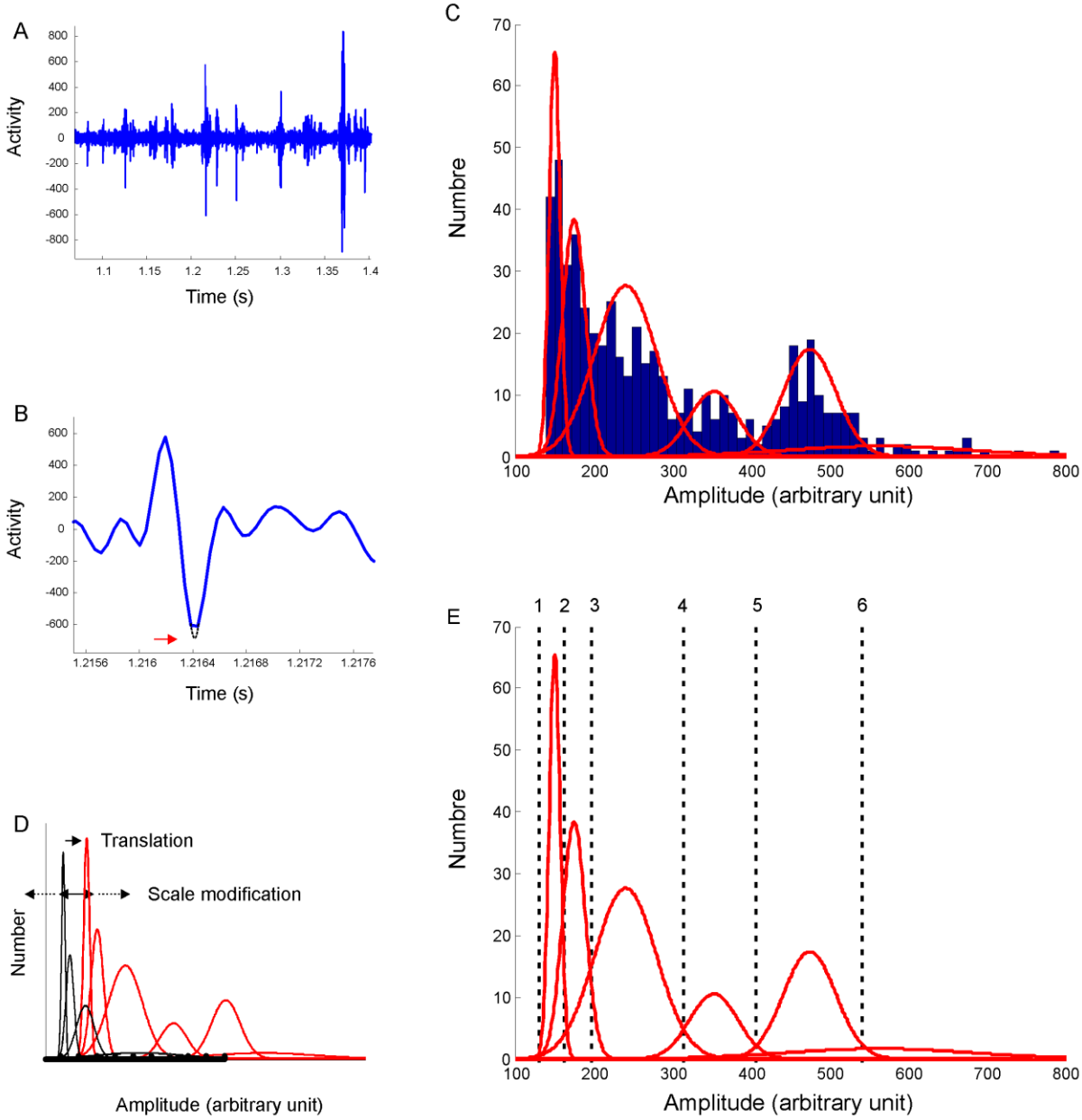

Figure 19 : (A) The graphic represents the activity recorded extracellularly at the level of one of the connectives between the last and the fore last ganglion. Many spikes can be observed with an important variation of the amplitude, which was used to distinguish the active units. (B) Low recording rate give approximate minimum value of potential of spikes as shown by the blue curve. Interpolation was used to calculate the true minimum value indicated by the red arrow. (C) Distribution of spikes' minimum values of potential for one recording, represented in blue, shows groups of data. Red curves represent clusters found by cluster analysis using the Mixmod software. (D) Clusters of all recordings were matched one another applying scale modifications and translations. (E) Several clusters were observed allowing us to distinguish 6 units. Dotted lines represent the 6 thresholds used to analyse all recordings.

The spike density vs. time was calculated for the 3 biggest units (4, 5 and 6) during the sensory stimulation (piston displacement) for a velocity of 15, 25 and 50 cm/s for experiments conducted in the laboratory. The time at maximal spike density (=TMSD) was calculated. It corresponds to the moment of the strongest activity.

Using information about the piston displacement (cf. Annexe 1) and taking into account the starting distance from the cerci, the distance of the piston from the cerci at a particular moment can be known. The distance between the piston and the end of cerci at the moment of the strongest activity was calculated. The air velocity (V) at a particular distance (d) from the moving object is defined in function of the diameter (D) and the velocity (V_0) of the object by the formula: $V=(V_0*(D)^3)/(d+D)^3$

Using this formula we calculated the air movement velocity around cerci when the activity is the strongest.

Results

We monitored the effects of stimulating the cercal system with air currents generated by the rapid movement of a piston toward test animals. The responses were monitored with electrophysiological recordings from the abdominal nerve cord of crickets under two conditions: with the animals in a quiet controlled laboratory arena, and with the freely-behaving animals in un-controlled field conditions. In both cases, piston movements caused significant increases in neural activity (figure 20.)

Neural activity evoked by an approaching object in the laboratory and in the field

Some noise generated by the piston remained present after processing the data. This noise was smaller than the spike amplitude of units 4 to 6, so the activity of these units could be analysed. The activity of units 1 to 3 could not be precisely recognised from noise, provided that the amplitude of their spikes is close to that of noise. The activity of units 4 to 6 increased when increasing the piston velocity in the laboratory (Fig. 21 solid lines) and in the field (Fig. 21 dashed lines). In the field this increase in spike frequency is more visible between 15 and 25 cm/s. The response frequency was lower in the field than in the laboratory, particularly for high velocities of the piston i.e. 25 and 50 cm/s. The difference in response

frequencies between laboratory and field conditions increased with increasing the piston velocity, for all the 3 units analysed (units 4, 5 and 6). We did not observe saturation of the response frequency for piston velocities that were used.

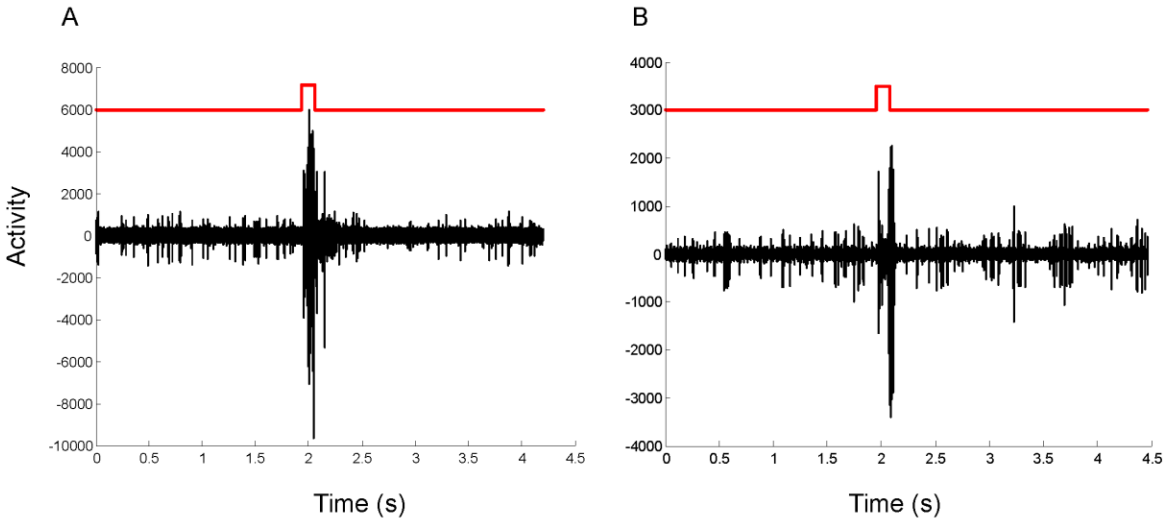

Figure 20 : Examples of electrophysiological recordings after filtering. (A) Recording under laboratory conditions (low background noise). An increase in the neural activity is clearly observed during the piston movement toward the cricket, indicated by the upward deflection of the red line. This movement was a unidirectional thrust of the piston (B) Field recording under natural (high background noise) conditions. The increase in the neural activity is clearly observed during the piston movement.

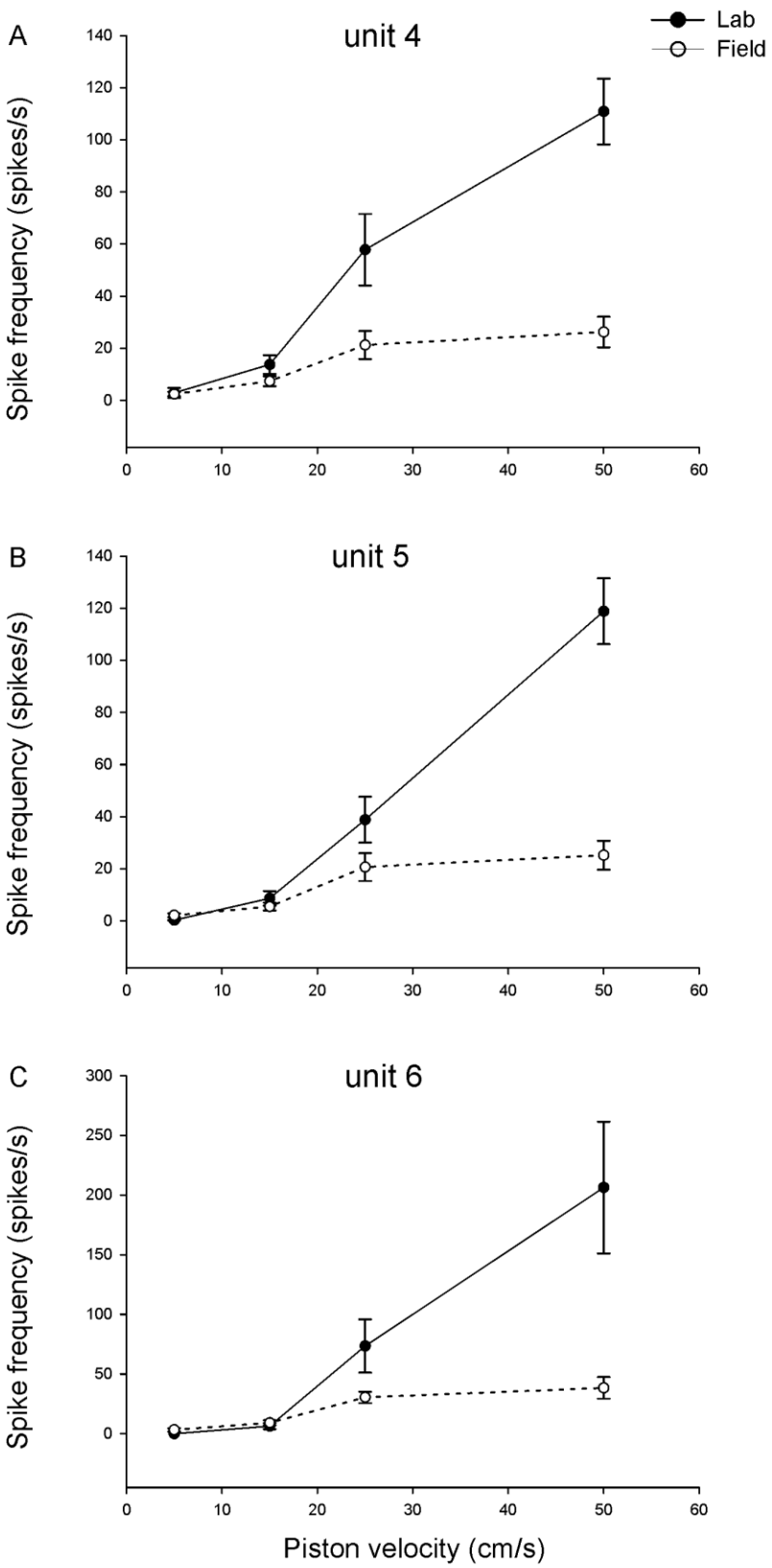

Figure 21 : Mean response frequency ± SEM during the sensory stimulation in function of piston velocity in the laboratory (solid line) and in the field (dashed line). (A) Unit 4. (B) Unit 5. (C) Unit 6.

Background activity

During control experiments in the laboratory, keeping the piston immobile, some neural activity was recorded (Fig. 22). Provided that in the laboratory the background noise was low, we can assume that the activity recorded in this condition corresponds mainly to the spontaneous activity. The activity of all units was higher in the field than in the laboratory, suggesting that the system responded to the background noise, which was higher in the field than in the laboratory. Units 1, 2 and 3 had higher spike frequencies than units 4, 5 and 6. The three smallest units seem to have similar rates of spontaneous activity. Response to background noises in the field varies according to units. Unit 3 responded more to background noise than unit 2 and 1. Units 4 to 6 the biggest ones respond a little or not to background noises.

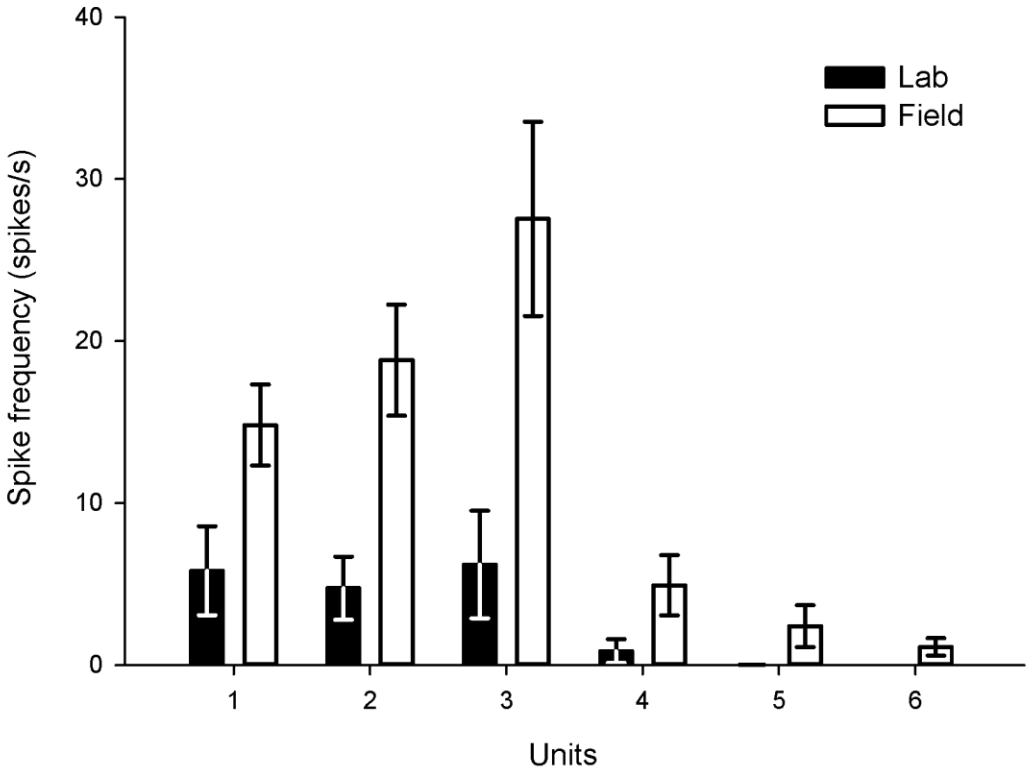

Figure 22 : Mean response rate ± SEM 6 different units identified during the control (no piston movement) in the laboratory (in black) and in the field (in white).

Activity temporal dynamics

The distribution of the activity versus time showed 2 peaks (Fig. 23). These 2 periods of strong activity were clear in all 3 units analysed (unit 4, 5 and 6) for piston velocities of 15 (Fig. 23A) and 25 cm/s (Fig. 23B). In the case of the highest velocity tested, 50 cm/s (Fig. 23.C) and for units 4 and 5, the density increased progressively to reach a maximum at 0.1s. For unit 6, the density showed 3 peaks for which amplitudes increased along the time. At TMSD (0.097s for 50 cm/s; 0.17s for 25 cm/s et 0.3s for 15 cm/s ; curves of figure 23) the wind velocity around the cerci tip was 8 mm/s.

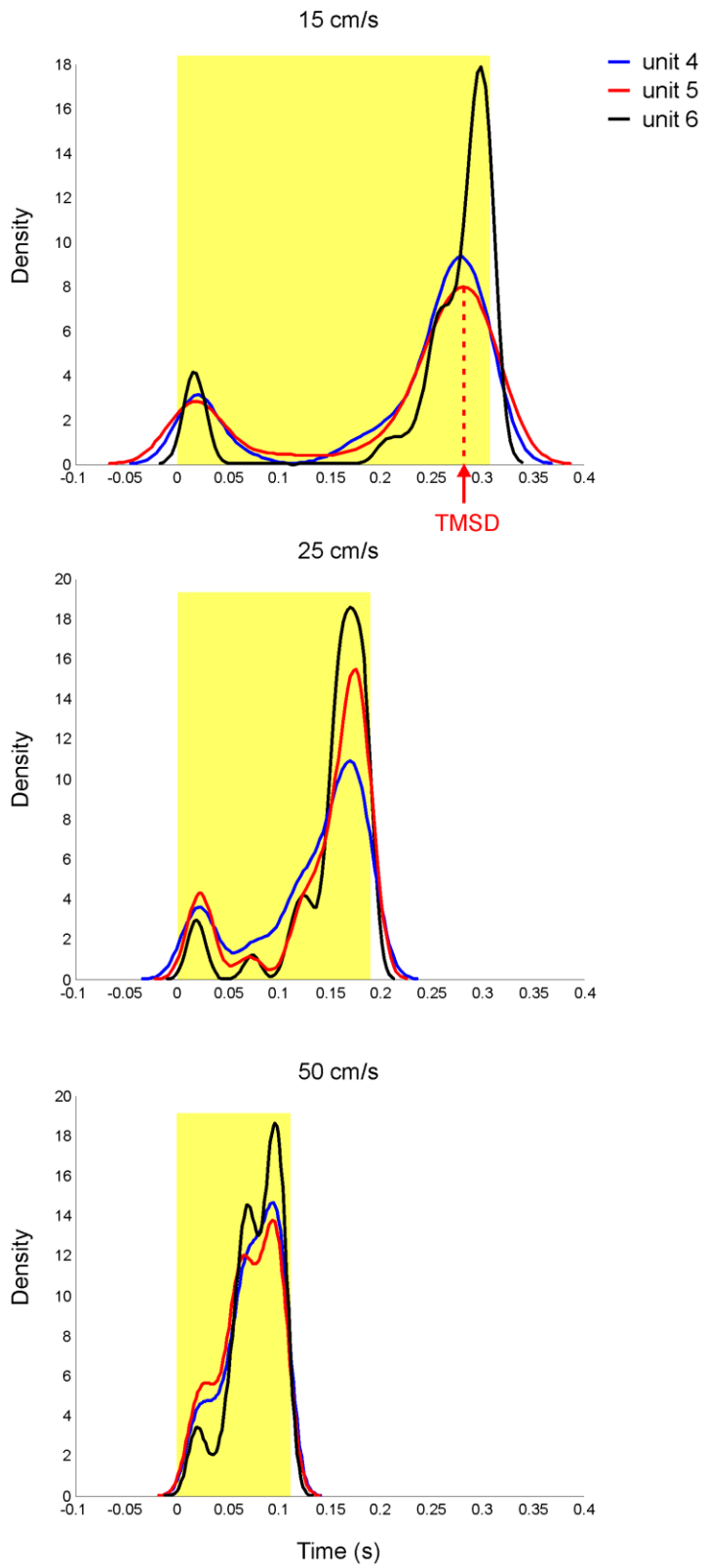

Figure 23 : The density of spikes for unit 4 (in blue), unit 5 (in red) and unit 6 (in black) during time. (A) Piston velocity of 15 cm/s. One example of time at maximal spike density (TMSD) is represented for unit 5. (B) Piston velocity of 25 cm/s. (C) Piston velocity of 50 cm/s. The piston movement is represented by the yellow area.

Neural activity and wind velocity

Values of the TMSD were measured on figure 23 for unit 6. We calculated the piston distance at the TMSD in laboratory experiments (0.74 cm at 15 cm/s; 0.86 cm at 25 cm/s; 0.94 cm at 50 cm/s). Using movies that were recorded in field experiments, we determined the time (i.e. the expected TMSD) at which the piston was at the distance calculated in laboratory experiments. Observed TMSD were calculated representing the density of spikes along the time (in the same way than for laboratory experiments).

The correlation between observed and expected values of TMSD is represented in figure 24. Most points are close to the red dotted line (representing observed=expected), 70% for 15 cm/s, 77% for 25 cm/s and 87% for 50 cm/s.

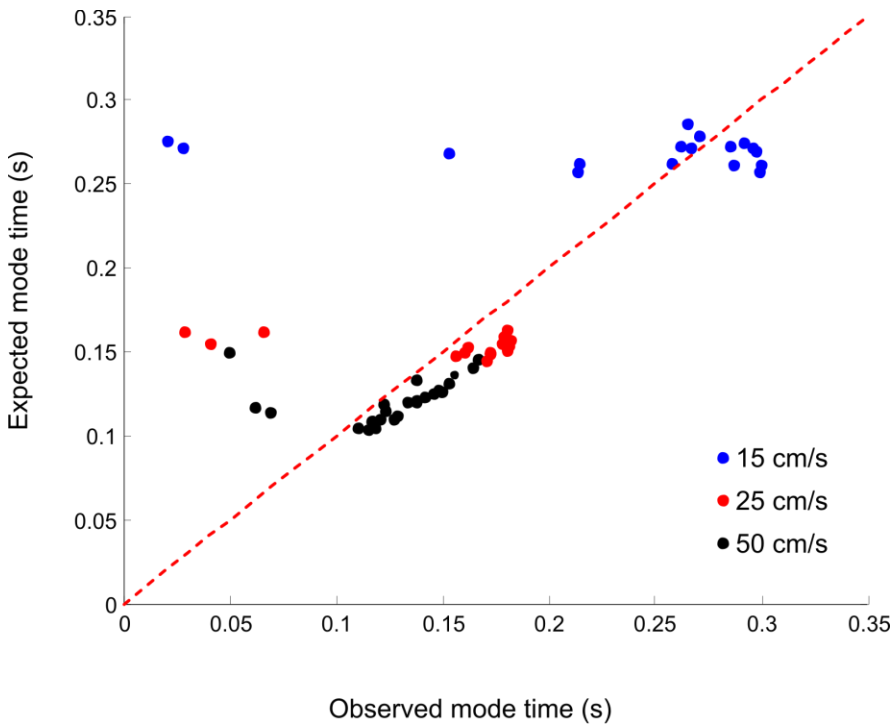

Figure 24 : Observed TMSD as a function of the expected TMSD for piston velocities of 15 cm/s (in blue), 25 cm/s (in red) and 50 cm/s (in black). The red dotted line represents equal values.

Discussion

We recorded the nervous activity in response to the approach of a piston simulating a predator on freely moving crickets in the field and on restrained crickets in the laboratory. Six units were distinguished and the activity of 3 of them was analysed in detail. Neurons encode information about the stimulus power since they increase their activity with increasing piston velocities. Their spike frequencies were higher in the laboratory than in the field in response to stimulation. During control trials (i.e. the piston did not move) the background activity was recorded. The background activity was stronger in the field than in the laboratory. Spike frequencies were heterogeneous along the time. The activity was strongest for an air velocity around the cerci of about 8 mm/s.

Background activity

The nervous activity recorded during the control condition (corresponding to immobile piston) in the laboratory probably corresponds to spontaneous activity since few or no background noise (like atmospheric wind or air generated by the displacement of the cricket) was present. Units 1 to 3 present spontaneous activities, while units 4 to 6 show little or no spontaneous activities (Fig. 22). The spike frequency was higher in the field than in the laboratory, particularly for units 1 to 3. The increase in the activity is probably due to the presence of background noises like atmospheric wind. The system responds to natural background noises and allows the cricket to extract information about this noise.

Modulation of neural activity

Spike frequency is smaller in the field than in the laboratory, particularly for high velocities (25 and 50 cm/s). Spike frequencies for small intensity stimulation (i.e. 5 cm/s) are approximately the same in the laboratory and in the field, the sensitivity did not decrease in the field. We can suppose that the decrease in the spike frequency observed in the field is not due to a modification of the sensitivity threshold. The observed decrease of spike frequency is proportional to the stimulus intensity.

Clague et al. (1997) observed a modulation of the spike frequency in presence of white noise in giant interneurons of the cercal sensory system. They interpreted this decrease as

adaptation phenomenon. Ours results, as theirs, show that neurons are still able to code stimulus power when neural activity of these neurons is modulated. Indeed, as shown in the Figure 21 in the field, in the presence of modulation, the spike frequency increases with an increase in the stimulus velocity. Clague et al. also showed in their experiments that the adaptation resulted in a decrease in the amount of information coded about the average stimulus power and that the adaptation does not function as a gain control. Our results show that there is not any decrease in their capacity to code the intensity of a stimulus, indeed for weak stimuli (5 and 15 cm/s) no decrease of the spike rate is observed.

The modulation of the spike frequency, particularly by adaptation, is widely spread in sensory systems and it was observed among others on vision, olfaction, audition, electroreception, mechanoreception (Laughlin, 1989; Torre et al., 1995; Clague et al., 1997; Ronacher and hennig, 2004; Benda et al., 2005). The adaptation can be defined as a change in the relationship between stimulus and response that has been induced by the level of the stimulus (Laughlin, 1989). Using this definition the decrease in spike frequency that we observed in our experiments could correspond to an adaptation phenomenon. Nevertheless, adaptation refers to a decrease in receptor sensitivity that occurs in the presence of a maintained stimulus (Torre et al., 1995). As explained above, we didn't see any reduction of the sensitivity. It is difficult to identify precisely the modulation phenomenon we observed here and more experiments are necessary to determinate the observed phenomenon.

We showed here that a modulation of the spike frequency occurs on natural environment in presence of a complex natural noise. Our results do not allow to conclude about the role of the modulation. We can suppose that it could help to avoid saturation of the neuronal responses in the presence of a strong stimulation superimposed on strong background noise. Indeed, we never observed any saturation event at high stimulus intensities.

Identification of the units

The six units were distinguished using differences in spikes amplitudes. The amplitude of spikes is function of the axon diameter and the proximity to the electrode. We can assume that spikes of small amplitudes came from small diameter projection neurons axon and big amplitude spikes were generated by big diameter projection neurons axon like giant interneurons. Unit 3 showed spontaneous activities and strong responses to piston movement

(data not shown). Previous experiments recorded spontaneous activities in interneurons 10-2 and 10-3 (Levine and Murphey, 1980), moreover these interneurons respond to air movements (Jacobs and al., 2008). We can hypothesize that the unit 3 corresponds to 10-2 and 10-3 interneurons. We did not record spontaneous activity for units 6 reinforcing the hypothesis that these neurons are giant interneurons like MGL and LGL (the two biggest interneurons described in the TAG of crickets) for which no spontaneous activity was observed (Murphey et al., 1977).

All units show an increase in the spike frequency during the piston displacement. It was observed both in the laboratory and in the field. This result shows that all units are implicated in the detection of predator attacks.

Detection of an attack

The observed increase of the response frequency during the piston movement confirmed that the cercal sensory system detect the weak air movement generated by the piston displacement in presence of low level background noise (in the laboratory) and in presence of higher level of background noise (in the natural environment).

The highest spikes density was observed at the end of the piston movement (Fig. 23). The analysis of the air velocity around cerci in function of the piston displacement showed that the closer was the piston, the higher was the velocity around the cerci (Casas and al., 2008; Kant and Humphrey, 2008). The air velocity around cerci at the moment of the strongest activity was about 8 mm/s. This value is higher than the detection threshold measured by Shimozawa and Kanou (1984) that was 0.03 mm/s. Nevertheless in our measurements the maximal response was taken into account, which does not correspond to the detection threshold. Moreover in the measurement of Shimozawa et al. the measured thresholds were very variable from one neuron to another and the mean response of neurons was about 3 mm/s for a frequency of 5 Hz.

Sensitivity in the field

We calculated the distance of the piston at the moment of the maximal response in the laboratory. Using these distance values and the movies we measured the time at which the piston was at these distances in the field. This gives us a prediction of the maximal response

in the field. A majority of observed TMSD are close and superior to the expected TMSD. This observation indicates that the background noise present in the natural environment affects the detection threshold but only weakly. Nevertheless a prediction of the TMSD could be possible.

QUATRIEME PARTIE

Etude du codage spatial des informations mécanosensorielles au niveau du ganglion abdominal terminal

Article 3

OpenFluo: A free open-source software for optophysiological data analyses

Fabienne Dupuy, Jérôme Casas, Anne-Geneviève Bagnères and Claudio R. Lazzari

Journal of Neuroscience Methods, 183, 195-201.

Abstract

Optophysiological imaging methods can be used to record the activity *in vivo* of groups of neurons from particular areas of the nervous system (e.g. the brain) or of cell cultures. Such methods are used, for example, in the spatio-temporal coding and processing of sensory information. However, the data generated by optophysiological methods must be processed carefully if relevant results are to be obtained. The raw fluorescence data must be digitally filtered and analyzed appropriately to obtain activity maps and fluorescence time course for single spots. We used a Matlab® environment to implement the necessary procedures in a user-friendly manner. We developed OpenFluo, a program for people inexperienced in optophysiological methods and for advanced users wishing to perform simple, rapid data analyses without the need for complex, time-consuming programming procedures. This program will be made available as stand-alone software and as an open-source Matlab® tool. It will therefore be possible for experienced users to integrate their own routines. We validated this software by assessing its ability to process both artificial recordings and real biological data corresponding to recordings of the honeybee brain.

Keywords: Calcium imaging, fluorescence maps, nervous activity, freeware

Introduction

Since the demonstration that action potentials are accompanied by changes in light scattering, birefringence and fluorescence (Cohen et al., 1968), interest has increased in the use of optical imaging techniques for recording nervous activity (Cohen et al., 1978; Galizia and Vetter, 2005). Various dyes sensitive to different ions or to membrane potential have been successfully used for the recording of neural activity (Galizia and Vetter, 2005). This technique has provided considerable insight in many areas, including molecular cascades, the mechanisms of neurotransmitter release, and the functional architecture of the cortex (Grinvald et al., 1986), since its initial application to studies of brain slices and cell cultures (Mason, 1993).

In the 1990s, optical imaging techniques were adapted for the recording of nervous activity in the insect brain *in vivo*. These techniques were used, in particular, to study the treatment of olfactory information by the antennal lobe of honeybees (Joerges et al., 1997; Galizia et al., 1998). This technique was found to be particularly useful for simultaneously measuring neural activity in different areas of the antennal lobe (Galizia et al., 1997; Joerges et al., 1997). It was subsequently successfully applied to studies of the olfactory systems of other insects, such as moths (Hansson et al., 2003; Carlsson et al., 2005), flies (Fiala et al., 2002; Wang et al., 2003) and ants (Galizia et al., 1999). Optophysiological methods have since been extended to other areas, including studies of the spatial coding of mechanosensory stimuli in the terminal abdominal ganglion of crickets (Ogawa et al., 1996; Ogawa et al., 2005), the visual system of flies (Borst and Egelhaaf, 1992; Haag et al., 2004; Kurtz et al., 2008; Elyada et al., 2009) and the auditory system of crickets (Baden and Hedwig, 2007). The transparency of larval zebrafish has been exploited for studies of neuronal activity using calcium-sensitive fluorescent markers (Fetcho et al., 1995; Brustein, 2003). The coding of olfactory signals (Tabor et al., 2004) and embryonic development (Ashworth & Bolsover, 2002; Ashworth, 2004; Brennan et al., 2005) have also been investigated by optophysiological methods in zebrafish. Techniques are now also available for calcium imaging on *in vivo* preparations of the mammal's brain, such as in mice (Stosiek et al., 2003; Dombeck et al., 2007).

This method is not so widely used in neurophysiology as expected from its undoubted utility, because its application requires technical expertise, not only for sample preparation, but also for data processing, which is particularly challenging for *in vivo* recordings, for

which the signal-to-noise ratio tends to be very poor. Once digitized, the data are usually recorded as large matrices, the processing of which requires an appropriate, efficient, automated software environment. Many research groups currently use custom-made software for these analyses. However, such software has the drawbacks of being adapted to a single type of preparation and not being freely available in most cases. Other freely available open-source programs, such as ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), can be used to process data of this type, but require the development and integration of appropriate modules for automated analysis. Consequently, no appropriate program is currently freely available to users without the time or know-how to develop their own software.

We present here OpenFluo, an open-source software for the analysis of optophysiological data specially designed for analyses of the spatial and temporal patterns of nervous system activity. This software is suitable for use in experiments on different animal models, using different preparations and dyes (e.g. ratiometric and non-ratiometric dyes). It processes data rapidly, making it possible to visualize optical activity in single recordings during the course of an experiment. It can also be used for the overall processing of data obtained in one or several experiments. OpenFluo provides output in the form of fluorescence time curves, activity maps and movies. It also generates standard tables of results for further statistical analysis.

Materials and methods

Optical imaging signals

Optical imaging involves recording changes in the intensity of light of a particular wavelength emitted by a fluorescent dye. Fluorescent dyes display sensitivity to particular ions (ion-sensitive dyes) or to membrane potential (voltage-sensitive dyes). Light emission by the dye depends on both the wavelength of the exciting light and the concentration of the particular ion or the membrane potential of the cell. Optophysiological methods thus involve measurement of the changes in light emission (fluorescence) associated with cellular activity. During experiments, the recording system (CCD camera) outputs a series of monochromatic images consisting of pixels and representing the intensity of the light emitted at each point on the recorded area, before, during and after stimulation. The amount and complexity of the data

to be managed depend on the spatial resolution (number of pixels) and the gray scale used by the camera, together with the frame rate and the duration of the recording.

The images generated are subjected to a series of calculations. The basic treatment involves the removal of background fluorescence and normalization of the data. These operations yield the relative variation in fluorescence during stimulation, which can then be compared between experiments. In some cases, such as in studies of *in vivo* preparations, this basic data processing procedure is insufficient for the detection of physiological signals. In such cases, the detection of small variations in fluorescence intensity triggered by the stimulus also requires the elimination of background noise and movement artifacts. Diverse filters and correction procedures must therefore be applied to the data, to reveal the biological signal.

We used the Matlab® environment to implement these procedures for the analysis of optophysiological data obtained with two types of dye: ratiometric (dyes responding differently to excitation at different wavelengths) and non-ratiometric (dyes excited by a single wavelength only).

User modules

OpenFluo contains two modules that may be used independently, according to the type of experiment and analysis desired. The first module can be used to process one recording at a time (QuickFluo, Fig. 25A). It was designed for the rapid inspection of data from a single experiment. The second module (FullFluo, Fig. 25B) can be used to analyze a large number of recordings, from a single or different experiments, simultaneously. Both analyses are based on the same mathematical procedures, but they render different amounts of information. FullFluo can also be used to establish standard procedures for automatic application to different datasets.

Each module is organized as a GUI (graphical user interface), facilitating the use of the software and the selection of parameters for the analysis.

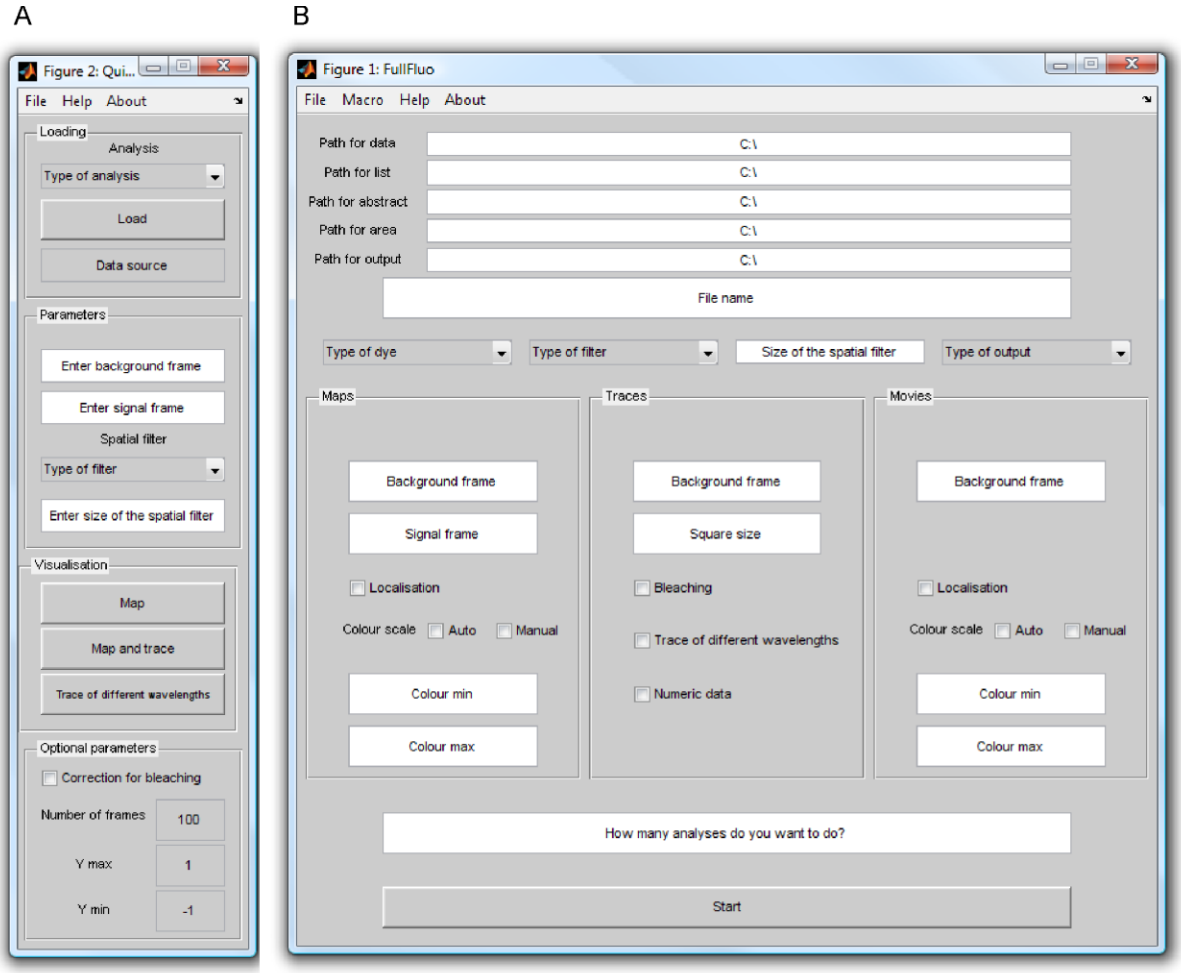

Figure 25 : Software interfaces: (A) *QuickFluo*, interface, for rapid processing of individual recordings during experiments. (B) *FullFluo*, for simultaneous processing of series of recordings, from one or several experiments.

Data processing

Data processing is summarized in Fig. 26. Background noise and artifacts were reduced by applying two filters and a correction, the exact mathematical procedures for which are described below. The two smoothing filters remove high-frequency noise in the temporal and spatial dimensions. Spatial noise is further reduced by adjusting the value of a given pixel as function of that of the neighbouring pixels, the number of which can be specified. Temporal noise is further reduced by adjusting the value of given pixel as function of the value obtained for the same pixel one frame before and one frame after the focal frame.

1- Spatial filters: The raw data generated by the CCD camera (Fig. 27A), are first spatially filtered with a low-pass filter. Three spatial filters are implemented in the program:

median, average and Gaussian filters, the size of which may be modified by the user. This treatment generates spatially smoothed images (Fig. 27B).

2- Temporal filter: The second data processing step involves applying a median filter in the temporal dimension. In this case, a new value is calculated for each pixel of a given frame, by calculating the median intensity of that pixel in three consecutive frames (previous, focal and subsequent), for every frame. This filter smoothes the data over time, removing high-frequency noise (Fig. 27C).

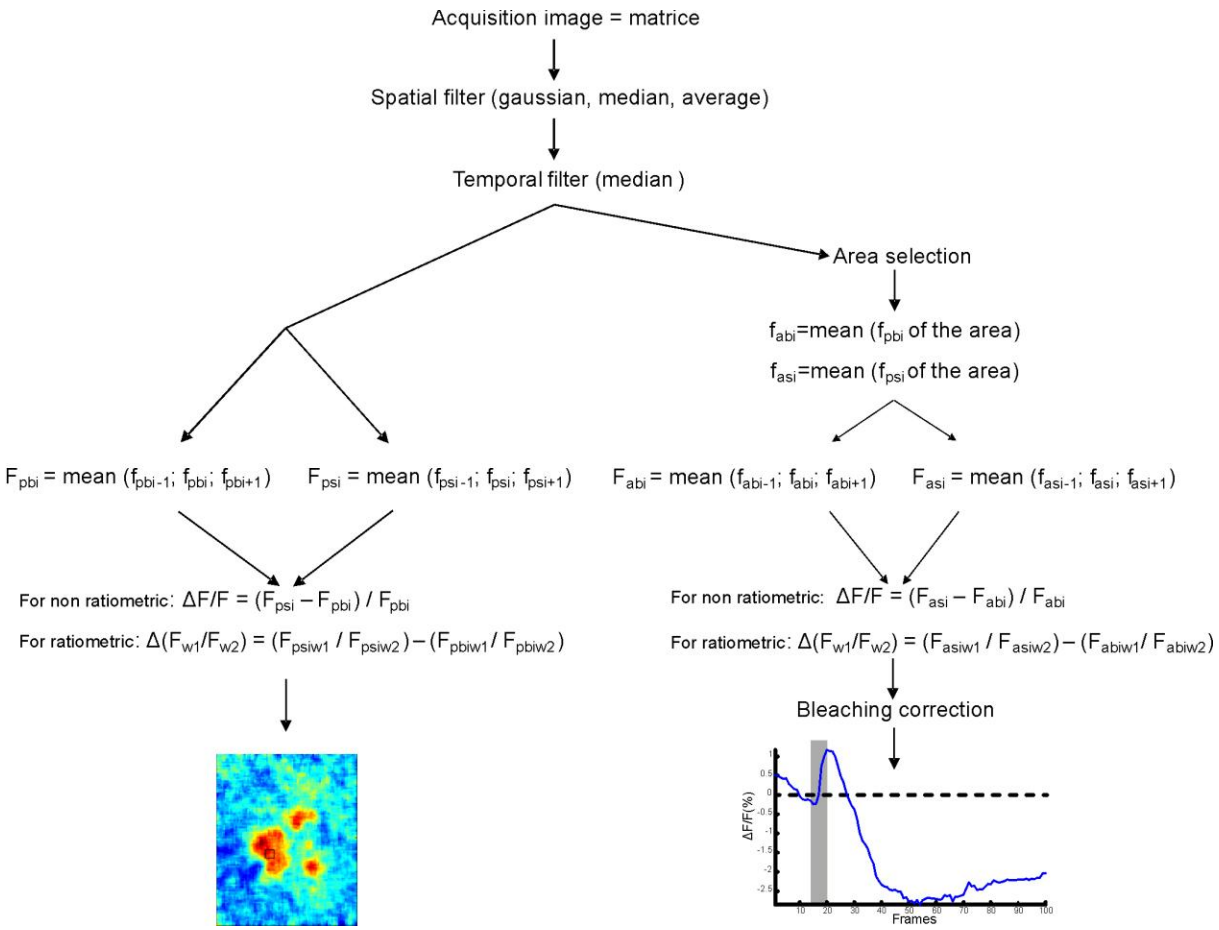

Figure 26 : Schematic diagram of the various steps in data processing. f_{abi}, fluorescence of a given area for the background image; f_{pbi}, fluorescence of a given pixel for the background image; f_{asi}, fluorescence of a given area for the signal image; f_{psi}, fluorescence of a given pixel for the signal image; F, mean of several f values, indices of F follow the same code as for f; w1 corresponds to wavelength 1 and w2 to wavelength 2.

3- Analysis and visualization of fluorescence changes: QuickFluo generates a sequence of images showing variations in fluorescence with respect to a reference image corresponding to a stimulus-free background selected by the user. The program then calculates the mean fluorescence intensity (F_{pbi}) of each pixel in the reference image, in the focal frame (f_{pbi}) and in the previous (f_{pbi-1}) and subsequent frames (f_{pbi+1}) (Fig. 26). The same procedure is applied to three images corresponding to stimulation conditions (i.e. F_{psi}), with the focal frame selected by the user (it is not necessary at this stage to have identified the precise moment at which the stimulus produces a response). The software then carries out pixel-to-pixel subtraction (ΔF) of the two sets of values and normalizes the result obtained by dividing by the background value ($\Delta F/F$), thereby generating a new image (the "primer image"; Fig. 26) depicting relative changes in fluorescence at a given moment after stimulation in a false-colour code (JET-code).

The primer image is then used to visualize changes in fluorescence in the area of interest during the recording period. The user defines a square zone of interest in the primer image in which activity should be analyzed. The software then applies a computation routine similar to that used to obtain the primer image. However, in this case, fluorescence changes are determined for the entire designated square area, rather than for individual pixels, as follows. The mean fluorescence intensity is calculated for the defined area in the same three previously defined images. This procedure calculates the background, averaging the values of the pixels of the square over space and time (in the three images). The same procedure is applied automatically to every image taken during the recording period (averaging pixel values for the area and then over the three images). Once this procedure has been completed for all the images, a time-curve is constructed in which ΔF is plotted as the percentage change in fluorescence due to stimulation (i.e. $\Delta F/F \times 100$).

Examples of the curves obtained are shown in Figs. 28B and 29B. Provided that fluorescence changes over time are plotted for the entire experiment, the user may now visualize the time point (i.e. the frame) at which the activity induced by the stimulus is maximal. The initial procedure used to generate the primer image can then be used to obtain an activity map for that time point and to readjust the recording parameters if necessary.

Finally, once the parameters for the analysis and the time course of activity have been determined, FullFluo can be used for the automatic processing of a dataset and the production of a false-colour video sequence of the spatial and temporal changes in fluorescence during a

single experiment. FullFluo can also export fluorescence variation data in the form of an ".xls" table, for quantitative and statistical analyses.

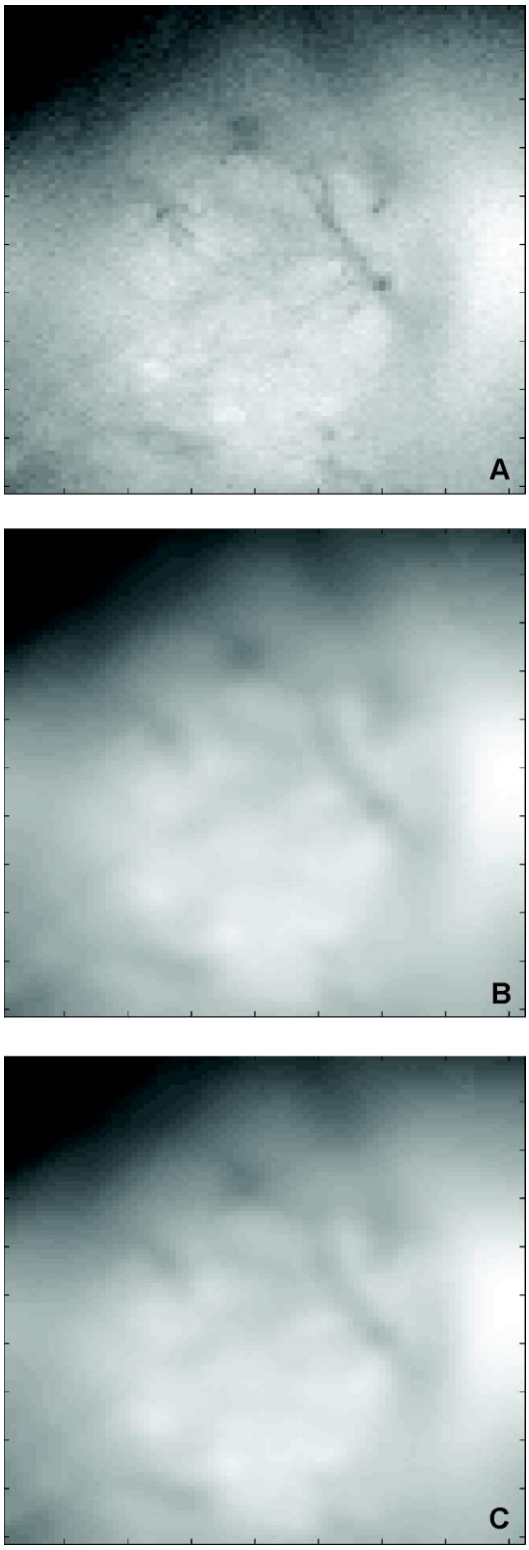

Figure 27 : Processing of the data for a single biological recording for honeybee antennal lobe. (A) Raw data. (B) Spatially smoothed data. (C) Spatially and temporally filtered image.

FullFluo also generates movies showing the changes in fluorescence in false colours for the whole recorded area of interest over the course of an experiment. The procedure for obtaining a map at a particular time point is automatically repeated for each frame, the results being presented as an AVI sequence of images. The various outputs of FullFluo are stored automatically.

4- Using ratiometric dyes: For ratiometric fluorescent dyes, OpenFluo calculates the ratio of the fluorescence emitted for two different excitation wavelengths, w1 and w2. The procedures described above are applied, for both w1 and w2. The software calculates F_{bi} and F_{si} for each wavelength and then $\Delta(F_{w1}/F_{w2}) = F_{siw1}/F_{siw2} - F_{biw1}/F_{biw2}$ (F_{asiw1} for area or F_{psiw1} for pixel in Fig. 26).

5- Correcting for bleaching and photoisomerization: Both these phenomena may decrease fluorescence, by destroying the dye molecules or by inducing transient or permanent structural changes induced by light. Thus, during the course of an experiment, total fluorescence emission (both background and signal) may decrease exponentially as a function of time and excitation conditions, such as pulse duration, light intensity and wavelength (Galizia and Vetter, 2005). No correction is required for spatio-temporal maps, but these artifacts must be corrected for time-course plots. Once the area of interest has been selected by the user and fluorescence between frames have been calculated, the software carries out a correction in which the first 10 and the last 10 $\Delta F/F$ values of the recording are used to fit the following function to the data: $a*e^{b*x}+c$ (Galizia and Vetter, 2005). The values of the three parameters *a*, *b* and *c* are estimated by least mean square adjustment. This function corresponds to the changes in fluorescence due to bleaching and photoisomerization and is subtracted from the original values. A time-course plot is generated showing changes in the fluorescence intensity of the area of interest resulting exclusively from nervous system activity.

6-Output: The software output consists of the following elements:

(a) A map of changes in fluorescence intensity, with increases and decreases indicated in a false-colours code (Figs. 28 and 29).

(b) Curves of changes in fluorescence intensity over time for the area or areas selected by the user (Figs. 28 and 29).

(c) AVI movies showing changes in fluorescence as a function of time, also in false colours.
(d) Tables of ΔF/F over time for the various areas selected.
(e) For ratiometric dyes, changes over time in fluorescence for one or two excitation wavelengths, and changes in the fluorescence ratio over time.

Input file

OpenFluo requires two types of data provided by the acquisition software as input. We use TILLvisION v4.00 (TILL Photonics GmbH Imaging System Software), but other programs can be used, provided that they supply recordings (sequence of frames) in AVI format and a text LOG file containing information about the experiment. A typical LOG file is presented as an example in the Help Menu. By default, OpenFluo is parameterized for understanding TILLvisION LOG files, but information can be organized in other ways, by editing and modifying the ABSTRACT module. OpenFluo obtains the following information from the LOG file: the frame dimensions in pixels, the total number of frames recorded, the duration and wavelength of excitation, horizontal and vertical binnings, the name of the storage file, and the name of the associated files for ratiometric dyes. Other experimental parameters of importance to the experimenter are usually saved, but not used directly by the software (date, time, etc.). A first routine called "ABSTRACT" recovers the information required to construct a table of parameters for subsequent use by OpenFluo. This routine remains accessible for consultation by the user, through Matlab®. It differs for the two types of dyes - non ratiometric and ratiometric - and provides specific information, such as the name and location of the associated files, for later use.

Testing the software on simulated data

For software validation, we assessed the ability of the program to process artificially generated data correctly. We generated artificial recordings, in which an intensity value was assigned to each pixel. Different simulated recordings were built in the form of 40 matrices of different pixel values, with each matrix corresponding to one frame. In one case, we introduced areas of higher or lower intensity of different sizes and durations (frames) and with different distances between activity areas on a uniform background (i.e. in the absence of noise). Another group of simulated recordings consisted of matrices simulating random noise

constructed from random values around a mean of 1700 arbitrary units (range from 1 to 4096) and a standard deviation of 20 (i.e. 0.5% of the whole range). The activation area was a square of 20x20 pixels, with random intensity values with a standard deviation of 20 around a mean of 1720, during frames 21-23.

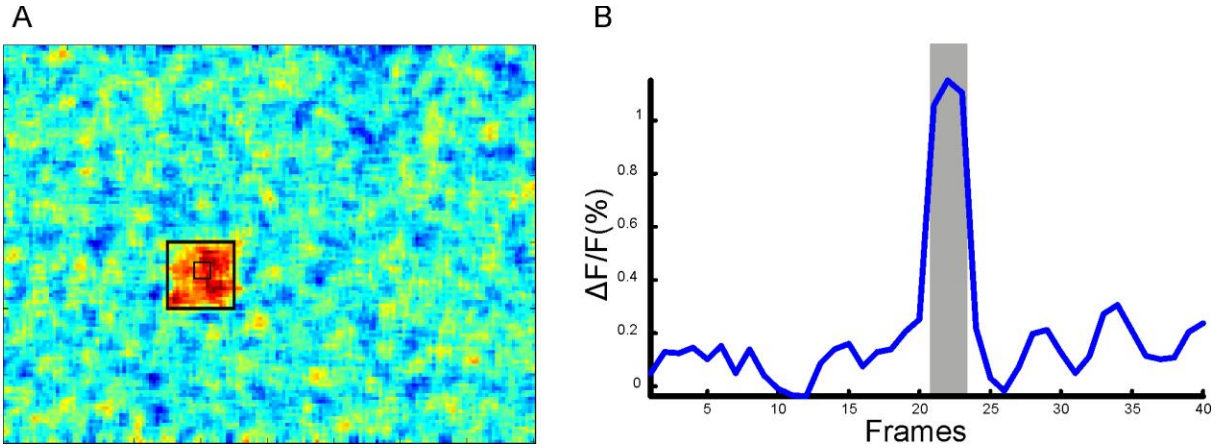

Figure 28 : Analysis of an artificial recording. The recording has a noisy background, with random values around a mean of 1700 and a standard deviation of 20 over 40 frames. The activation area presents random values with a mean of 1720 and standard deviation of 20 (large black square) from the 20th to the 22nd frame (gray area). Sample frequency: 5 fps. The small black square indicates the area used for time-course analysis.

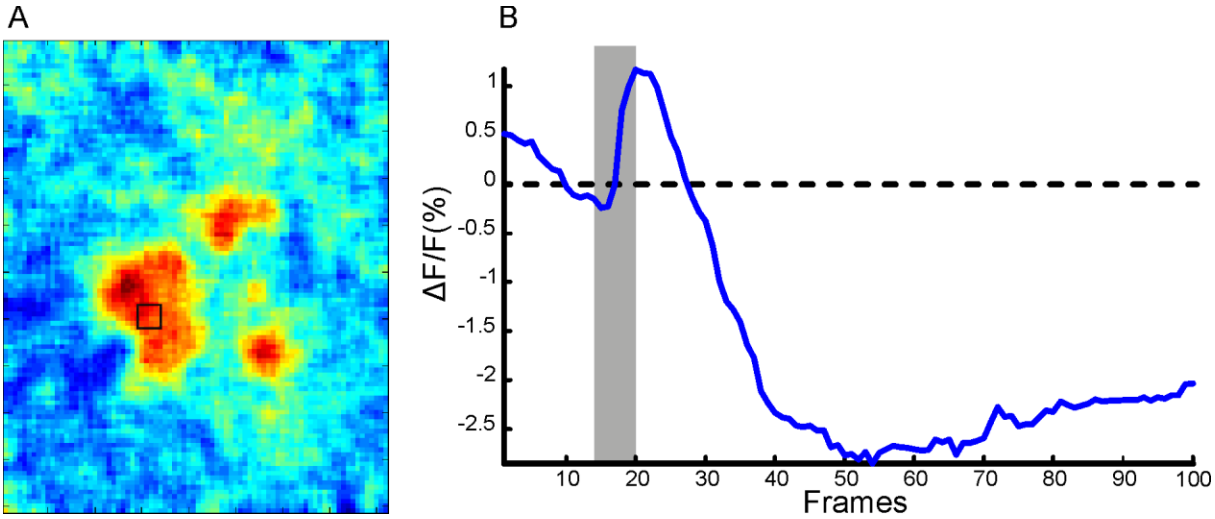

Figure 29 : Analysis of a biological recording from the antennal lobe of the honeybee *Apis mellifera* incubated in Calcium-green-2-AM for 1 hour. The antenna of the honeybee was stimulated with 4 µl of octanol for 5 frames (1 s; gray area). Three areas of activity are shown on the map. Sample frequency: 5 fps. The small black square indicates the area used for time-course analysis.

Application of the software to biological data

We tested the software on real biological data. We obtained recordings of calcium activity in the olfactory system of the honeybee, a well established model system for calcium imaging, from the *Centre de Recherches sur la Cognition Animale* (Toulouse, France). These recordings were obtained with standard recording methods (Galizia et al., 1998). *Apis mellifera* bees were anesthetized by cooling and fixed in a Plexiglas chamber. The head was immobilized and a window was opened in the frontal cuticle to expose the antennal lobes. The tracheae and the neurolemma were gently removed. We dissolved Calcium-Green-2AM (50 µg) dye in 50 µl Pluronic F-127 (20% in dimethylsulfoxide) in 800 µl of Ringer solution. Bees were subjected to bath incubations, in the dark, in a humid atmosphere, on ice beds. The brain was thoroughly rinsed with Ringer solution.

Optical recordings were carried out with TILLvisION v4.00 (TILL Photonics GmbH Imaging System Software). The bee was placed under an epifluorescence microscope (Olympus BX-70WI) with a 10x, NA 0.3, water immersion objective (UMPlanFL Olympus). Recordings were taken with a 640 x 480 pixel 12-bit monochrome CCD-camera (TILL Imago) cooled to -12°C. Each recording consisted of 100 frames, at a rate of 5 double frames per second. The antennae of the bees were stimulated by an air-puff loaded with octanol.

Results

Performance of the software with simulated data

The two types of output provided, together with the results obtained with OpenFluo for the processing of artificial recordings are shown in Fig. 28. A map is presented, together with a time course for a noisy recording with a variation of fluorescence of 1.1%, a low level of variation for biological recordings (Sachse et al., 2003; Sandoz et al., 2003). Even weaker signals were clearly identified in both activity maps and time-course plots. For example, a signal covering around 20 pixels was still clearly identifiable for a maximum of $\Delta F/F$ of 0.7% within the activated area in conditions of 0.2% background variation (data not shown). In further tests, not described here, OpenFluo was able to distinguish two active points separated by only 1 pixel, using average or Gaussian filters two or three pixels in size, in a noise-free background. Moreover, signals lasting only two frames were also clearly detected.

The performance of OpenFluo with biological data

We applied the software to calcium activity measurements on honeybee antennal lobes, which we analyzed with OpenFluo (Fig. 29). Three different areas of activity were observed. The time course shown in Fig. 29B relates events for the square area marked on Fig. 29A. A short activation phase occurred between frames 16 and 20, when ΔF/F reached about 1.5%, followed by a long inhibition phase in which ΔF/F was negative. At the end of the recording, fluorescence intensity returned to basal levels. The results obtained were consistent with the typical activity maps obtained for studies of bee antennal lobes using a bath-applied calcium-sensitive dye (Sandoz et al., 2003).

Discussion

We have developed free open-source software for optophysiology, OpenFluo, which presents several advantages over other currently available programs. It is particularly appropriate for people seeking an easy-to-use, simple platform suitable for use in various types of experiment (*in vitro* and *in vivo*).

OpenFluo has two user-friendly interfaces, QuickFluo and FullFluo, for analyses of different degrees of complexity. QuickFluo can be used for rapid, interactive analyses of changes in fluorescence in any region of the image selected by the user. Thus, the analytical parameters (area of interest) can be established with precision and the recording conditions adjusted during the experiment (e.g. duration of excitation). Once parameterized, FullFluo automatically performs a complete analysis and saves data from single and multiple experiments, without the need for user intervention in the processing of individual datasets.

The software was tested with both artificially generated and real data. OpenFluo performed efficiently, resolving small changes in fluorescence (0.7%), over a small area (1 pixel) and lasting only a short time (2 frames). The analysis of biological data yielded results similar to those obtained with other methods of analysis.

In some of the more extreme conditions tested, but for which the results are not presented, very large spatial filters were found to generate red areas (i.e. high ΔF/F) on maps that did not correspond to activated areas. Close observation of the time course is required to exclude these false activation areas. Increasing the size of the square used to calculate fluorescence changes decreased both noise and signal. Selection of the most appropriate values of these parameters therefore appears to be very important.

The software is available as a stand-alone application, and no Matlab® license is therefore required, and in versions for Windows, Linux and Macintosh systems.

The development of OpenFluo in Matlab® makes it possible to adapt this software, modifying it for specific tasks. As Matlab® is a very popular system, many modules are available, and there is an active community of users and discussion forums. Users needing help to solve specific problems should therefore be able to find the tools they need rapidly, or to discuss the problem with Matlab® users.

We could have used other systems, such as Java. Indeed, another open-source program for image analysis, ImageJ, is written in Java. However, Matlab® has several advantages over Java, including its ease-of-use and the simplicity of programming. Furthermore, the multitude of Matlab® toolboxes available makes it possible for programmers to choose from a large number of prewritten functions when trying to accomplish time-consuming or difficult tasks. These tools facilitate effective software development. Our version of OpenFluo is already quite rapid, but its performance should gradually improve, with the addition by users of new Matlab® adapted for a quicker treatment of the different functions.

Optophysiological methods are frequently used in neurosciences and by many laboratories. In many cases, data are acquired and analyzed by custom-made software that is not freely available. The open-source and the stand-alone (Windows, Linux and Macintosh operating systems) versions of our software can be downloaded freely from *http://casas-lab.irbi.univ-tours.fr/openfluo.html* and the open-source version also from the Matlab® website (http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/24729). This, together with its open-source nature, makes it possible to envisage continual refinement for the benefit of all, with potential improvements and the incorporation of new analysis methods being made available to the entire scientific community. One of the more interesting features of OpenFluo is the possibility of adapting the software to new types of analysis and recording. Thus, OpenFluo is a program capable of performing many basic and fundamental data processing procedures and is both easy-to-use and amenable to modification.

Acknowledgments. We warmly thank J.-C. Sandoz for fruitful discussions and valuable suggestions. We also thank Mélanie Body and two anonymous reviewers software testing and useful comments. This work received financial support from the European Community (Customized Intelligent Life Inspired Arrays, CILIA project; Contract grant number: FP6-IST-016039), the CNRS and the University of Tours (France).

Etude optophysiologique de l'activité calcique du ganglion abdominal terminal du grillon *Nemobius sylvestris*

Fabienne Dupuy, Jérôme Casas and Claudio Lazzari

Introduction

Dans la plupart des systèmes sensoriels les paramètres des stimuli sont représentés par un profil spatiotemporel unique. La ségrégation spatiale des neurones en fonction de leur sensibilité à un paramètre génère un codage spatial de ce paramètre. Cette représentation spatiale du paramètre forme ce que l'on interprète comme une carte neuronale. De nombreuses études électrophysiologiques et anatomiques ont été réalisées depuis plusieurs dizaines d'années sur le ganglion abdominal terminal du grillon de l'espèce *Acheta domesticus*. Celles-ci montrent qu'il y a une organisation spatiale et un profil de connections entre des neurones sensoriels et des interneurones géants, en fonction de leur sensibilité à certains paramètres du stimulus. En effet, la spécificité de ces neurones vis à vis de la direction du flux d'air et leur ségrégation pour une même sensibilité à ce paramètre, composent la carte neuronale de la direction du courant d'air (Miller et Jacobs, 1984 ; Bacon et Murphey, 1984 ; Jacobs et Miller, 1985 ; Jacobs et al., 2008). Toutefois ces données électrophysiologiques et anatomiques ne donnent qu'un aperçu du profil spatio-temporel global présent au sein du ganglion. En effet, ces informations sont partielles (un seul ou quelques neurones sont enregistrés) et indirectes (puisque c'est le recoupement des données anatomiques et électrophysiologiques qui permet la reconstitution de cette carte). Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent l'imagerie optophysiologique permet d'enregistrer l'activité d'un groupe de neurones, d'une zone particulière du cerveau ou d'une autre partie du système nerveux, *in vivo*, par l'utilisation de colorants sensibles au calcium (Galizia et Vetter, 2005). Le colorant pouvant être introduit dans l'ensemble des cellules du système nerveux, cette technique apporte une dimension spatiale, qui ne peut être obtenue avec les techniques classiques d'électrophysiologie. Cette technique a donc permit d'étudier le codage spatio-temporel de différentes informations sensorielles au niveau des structures nerveuses impliquées dans leur traitement (Galizia et al., 1997; 1999 ; Hansson et al., 2003; Carlsson et al., 2005 ; Fiala et al., 2002; Wang et al., 2003). Cette technique a été appliquée dans le cas du grillon et de l'étude du système méchanosensoriel par Ogawa et al. (1996) sur *Gryllus bimaculatus*. Ogawa a introduit un colorant fluorescent appliqué iontophorétiquement dans un interneurone géant, ce qui a permit de montrer qu'une excitation électrique des neurones sensoriels (Ogawa et al., 1996), ainsi que l'application d'un courant d'air sur les cerques (Ogawa et al., 1999), déclenchent une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans les dendrites des neurones géants. Cette augmentation de Ca^{2+} est postérieure aux bouffées de

potentiels d'action, enregistrés au niveau de l'interneurone géant. La présence de potentiels d'actions dans le neurone est nécessaire au déclenchement de l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire est donc sensible à l'activité post synaptique (Ogawa et al., 2002). De plus il a observé que différentes branches dendritiques d'un même neurone ont des sensibilités différentes à la direction du stimulus et que cette sensibilité est différente de celle du neurone dans son ensemble (Ogawa et al., 2004). Il a également montré que l'accumulation de calcium au niveau post-synaptique induit un mécanisme de dépression à court terme (Ogawa et al., 2001). Enfin, l'auteur a utilisé la technique d'imagerie calcique dans le but d'étudier le codage spatial sur l'ensemble des neurones sensoriels du ganglion abdominal terminal. La dispersion du signal optique a fortement perturbé l'observation d'un profil spatial, mais il a toutefois pu observer différents profils spatiaux pour différentes directions de stimulation (Ogawa et al., 2005).

Les études préalablement réalisées n'ont donc pas permis une étude précise de la carte neuronale présente au niveau du TAG. De plus, ces études ont été réalisées sur des ganglions isolés, où, seul le ganglion terminal et les deux cerques ont été utilisés. Ceci implique donc que toutes les informations rétrogrades ainsi que les informations d'autres structures sont supprimées. Les conditions sont donc très éloignées des conditions naturelles dans lesquelles se réalisent normalement le traitement de ces informations mécanosensorielles. En résumé, ces expériences nous montrent qu'il y a bel et bien des flux de calcium liés à l'activité neuronale et déclenchés par des courants d'air. Nous souhaitons donc appliquer cette technique sur *Nemobius sylvestris*, notre modèle, dans des conditions plus proches des conditions naturelles. Nous espérons pouvoir étudier tout d'abord le codage spatio-temporel de la direction du courant d'air, puis élargir l'étude à d'autres paramètres du courant d'air tels que la vitesse et l'accélération. Ces résultats constitueraient un premier pas vers l'étude de ce codage dans un environnement bruité.

Matériel et méthodes

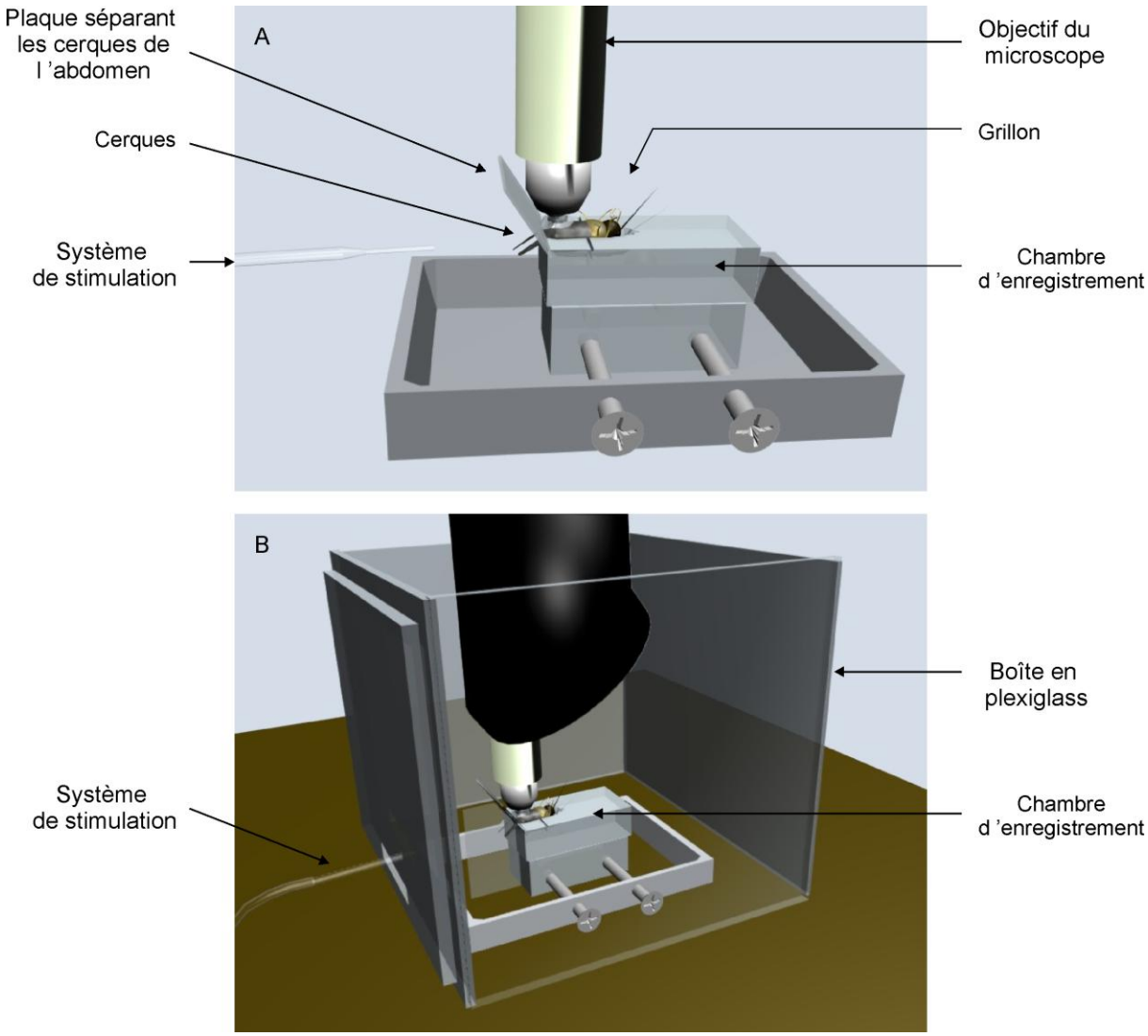

Figure 30: Préparation pour l'imagerie calcique. (A) Le grillon est fixé dans une chambre d'enregistrement qui permet d'isoler les cerques de l'abdomen. Ceci permet de garder l'abdomen dans un bain de solution Ringer et les cerques secs afin de ne pas modifier le mouvement des poils. (B) Une boite en Plexiglas® a été placée autour de la préparation afin d'éliminer tout mouvement d'air excepté ceux générés par le système de stimulation sensorielle.

Préparation des insectes

Des grillons mâles adultes récoltés dans le bois des Hâtes prés de Tours (47°20'07''N, 0°45'10''E) ont été utilisés pour les enregistrements. Les grillons ont été placés dans la glace afin de les endormir. Après avoir retiré leurs pattes, ils ont été placés sur le dos dans la chambre d'enregistrement (Fig. 30), et fixés grâce à de la paraffine fondant à basse température. Une fenêtre a ensuite été ouverte dans l'abdomen au niveau du deuxième

segment abdominal. Tous les tissus adipeux, trachées, tissus de l'appareil digestif et excréteur obstruant l'accès au ganglion ont été retirés. Le ganglion a été rincé et maintenu dans du liquide physiologique (Ringer) (NaCl 150mM, KCl 2,7 mM, $CaCl_2.2H_2O$ 1,8 mM, glucose 22 mM et $NaHCO_3$ permettant d'obtenir un pH de 7,2). Les cerques ont été isolés du reste de l'abdomen par un carré de plastique, permettant ainsi de les conserver secs (Fig. 30). Le ganglion a ensuite été incubé dans 60 µL de solution colorante pendant 3 heures, solution composée de 50µg de Fura-2-AM dissout dans 20 µL d'acide Pluronique F-127 (Molecular probe, Oregon, USA) et dans 1,250 µL de solution Ringer. La cavité de l'abdomen a ensuite été abondamment rincée avec la solution Ringer, afin de retirer l'excédent de colorant qui n'est pas entré dans les cellules.

Le choix du colorant

Le colorant Fura2 est un colorant ratiométrique, présentant un changement de sensibilité à la présence de Ca^{2+} pour des stimulations de différentes longueurs d'ondes. Cela se traduit par une augmentation de la fluorescence émise lorsque la concentration en calcium augmente pour une stimulation à 340 nm et une diminution de la fluorescence émise pour une stimulation à 380 nm. Cette caractéristique des colorants ratiométriques permet de s'affranchir des problèmes d'artéfacts dus à des mouvements de la préparation, puisque lors de mouvements, on observe une variation de la fluorescence dans le même sens pour les deux longueurs d'onde d'excitation. Grâce à l'utilisation de ce colorant et l'observation de variations opposées pour les deux longueurs d'onde d'excitation, nous pouvons confirmer que les variations de fluorescences observées sont bien dues à des flux de calcium dans la cellule.

Enregistrements

Les enregistrements ont été réalisés avec un système d'imagerie T.I.L.L. Photonics (Martinsried, Germany). Les grillons ont été placés sous un microscope à épifluorescence (BX51WI Olympus, France) avec un objectif à immersion à eau de 10x (NA, 0,3 ; Olympus, France). La préparation a été excitée avec une lumière de longueur d'onde 340 et 380 nm générée par un monochromateur (T.I.L.L. Polychrom IV). L'émission a été enregistrée par une camera CCD (T.I.L.L. Imago) (640 x 480 pixel, 12-bit, refroidie à -12°C). Au cours de ces enregistrements, les mécanorécepteurs des cerques ont été stimulés par un courant d'air

d'une durée de 1 s correspondant à 5 images de la caméra, plus précisément de la 15e à la 20e image. Pour chaque enregistrement 100 images ont été capturées par la caméra à une fréquence de 5 Hz.

Les courants d'air constituant la stimulation sensorielle ont été générés grâce à une pompe reliée à une électrovanne, dont l'ouverture a été contrôlée par le logiciel Till Vision. Ces stimulations sensorielles ont été appliquées depuis trois directions différentes, 180°, 90°, 270° relatives à l'axe longitudinal du corps du grillon. Des contrôles (sans courant d'air) ont également été enregistrés.

Quatre groupes de grillons ont été constitués :

- G1 : groupe contrôle de grillons intacts, aucun traitement particulier n'a été appliqué.
- G2 : L'entrée d'informations visuelles a été supprimée. Pour cela de la peinture acrylique noire a été appliquée sur leurs yeux.
- G3 : Toute information provenant des centres supérieurs au ganglion terminal a été supprimée par lésion des connectifs.
- G4 : Les informations visuelles ainsi que les informations des centres supérieurs ont été supprimées suivant les mêmes procédures.

Analyses

Les données acquises avec le logiciel Till Vision ont ensuite été analysées grâce au logiciel OpenFluo (Dupuy et al., 2009). La variation de fluorescence a été calculée en appliquant ΔF340/ΔF380=(F340 signal- F340 background) / (F380 signal- F380 background) en prenant pour background les images 9 à 11 (Fig. 31 bande verte). Les cartes d'activités et les tracés temporels générés nous ont permis d'analyser à la fois les caractéristiques spatiales et temporelles des réponses. La dérivée première de la variation de fluorescence ΔF340/ΔF380 a été calculée et représentée afin de confirmer la présence de signaux calciques. Un seuil a été déterminé empiriquement pour chaque individu, la dérivée première devant dépasser ce seuil pour qu'une variation de fluorescence soit considérée comme une réponse calcique. De plus, cette représentation des résultats permettant d'observer des variations de pente, nous a également permis d'analyser plus précisément la dynamique des réponses. Les latences ont été mesurées entre le début de la stimulation sensorielle et l'image pour laquelle la dérivée dépasse le seuil établi, comme indiqué précédemment. Les amplitudes ainsi que les

latences ont été comparées en utilisant le test de Kruskall-Wallis et le test de Behrens-Fisher pour les comparaisons post-hoc.

Résultats

Nous avons obtenu des signaux au niveau du ganglion abdominal terminal chez *N. sylvestris*. Les tracés temporels montrent une augmentation de la fluorescence lors d'une excitation avec une lumière de 340 nm, et une diminution pour une excitation avec une lumière de 380 nm (Fig. 31). Cette activité du colorant correspond à une augmentation du calcium intracellulaire. Ces réponses apparaissent avec une longue latence et une longue durée (plusieurs secondes) (Fig. 31). Afin d'étudier les bases physiologiques de cette activité nous avons testé quatre groupes d'insectes: G1: grillons intacts, G2: sans information visuelle, G3: sans information des centres supérieurs et G4: sans information visuelle ni information des centres supérieurs.

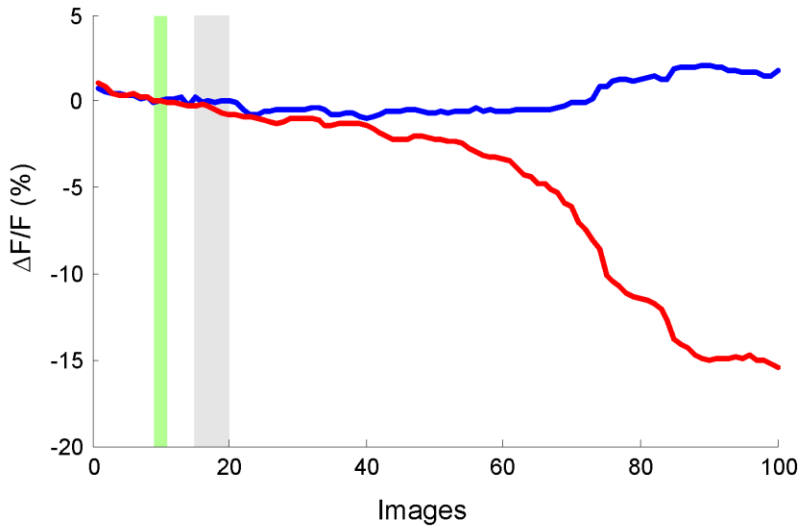

Figure 31 : Activité calcique au niveau du TAG du grillon, générée par une stimulation des cerques par un courant d'air (barre grise). Chaque courbe représente la variation de fluorescence au cours du temps (au cours des 100 images enregistrées par la caméra), pour les deux états du Fura-2AM (courbe d'émission du Fura-2 non lie au calcium en rouge et lié au calcium en bleu). La bande verte correspond aux images 9 à 11 utilisées comme background dans le calcul de la variation de fluorescence. Taux d'enregistrement des images: 5 images par secondes.

Au niveau temporel, les enregistrements présentent un fort blanchiment (« bleaching » en anglais) qui n'a pas été compensé par le ratio des valeurs de fluorescence des deux longueurs d'onde utilisées (Fig. 31 et Fig. 32A). L'émission de fluorescence pour une excitation à 380 nm semble plus affectée par le phénomène de blanchiment que lors d'une excitation à 340 nm. De ce fait, la courbe du ratio présente une pente positive. Afin de différencier les signaux calciques du blanchiment, nous avons calculé la dérivée première à chaque point de la courbe (Δ(F340/F380)). Ceci permet de représenter la pente de la courbe (Δ(F340/F380)) en fonction du temps (Fig. 32B). Plus la pente de la courbe de variation de fluorescence en fonction du temps est importante, et plus la valeur de la dérivée est importante. Ainsi un changement rapide dans la variation de fluorescence est plus clairement identifiable et les véritables signaux calciques sont plus facilement repérés. La figure 32A représente un exemple de tracé temporel de la variation de fluorescence. Tout au long de l'enregistrement, on observe une augmentation du ratio F340/F380 dont une partie est constante et due au phénomène de blanchiment. La figure 32B représente cette fois la dérivée première de la courbe de la figure 32A. Nous pouvons observer des pics lors d'une augmentation importante et rapide de la fluorescence. Ceci nous montre également que plusieurs phases d'entrée de calcium dans les cellules se produisent. Dans notre exemple, deux phases d'entrée de calcium ont eu lieu à 2 secondes d'intervalle. De 1 à 3 phases ont pu être observées pour les différents enregistrements.

Dans cette série d'expériences, des enregistrements de 6 individus sur 24 ont montré des réponses calciques. Les zones activées (indiquées par des flèches blanches Fig. 33) sont clairement identifiables par rapport au bruit de fond et leurs contours sont relativement bien définis (Fig. 33). De 2 à 9 zones différentes d'activités ont été observées ayant un diamètre de 37,19 µm ± 1,38 (moyenne ± S.E.M.). L'utilisation de points de repères, tels que les trachées associés aux données anatomiques obtenues par Insausti et al. (2008), indique que la région supérieure du ganglion a été enregistrée, région où se trouvent les IGNs 7-1a, 8-1a et 8-2a (pour plus d'information cf Fig. 9 de l'introduction).

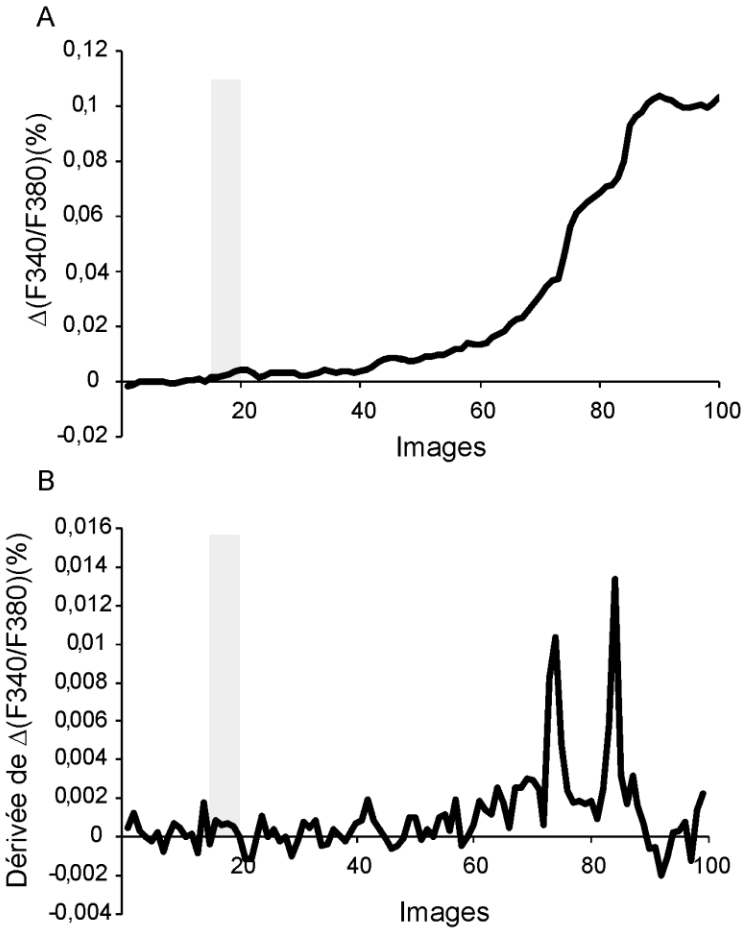

Figure 32 : (A) Tracé temporel des réponses représentant les variations de fluorescence Δ(F340/F380) au cours du temps (ou des images enregistrées par la caméra). 1 image= 0.2 s. La barre grise représente la stimulation sensorielle. (B) Dérivée première de la courbe 3A, donc la dérivée première de Δ(F340/F380) en fonction des images. Les pics sur la courbe indiquent des variations rapides de Δ(F340/F380), donc une réponse calcique. Taux d'enregistrement des images: 5 images par secondes.

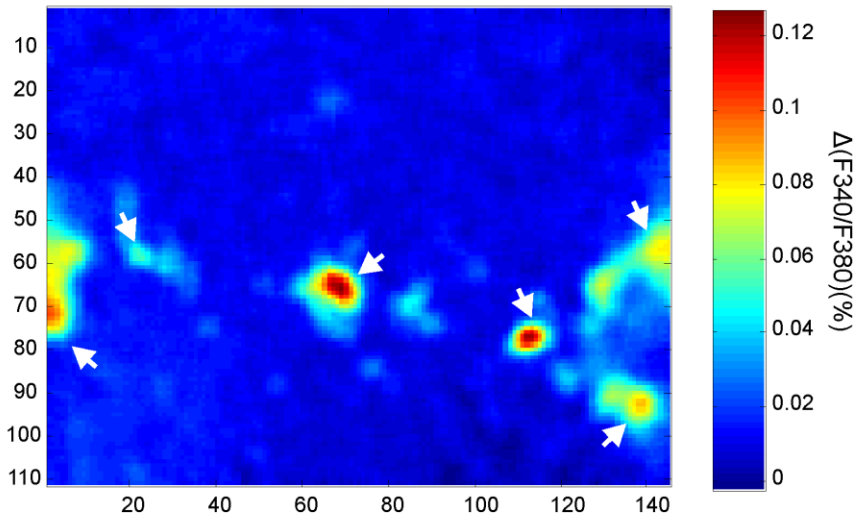

Figure 33 : Carte d'activité lors d'une stimulation à 0°. L'échelle de couleur représente la variation de fluorescence, la couleur rouge représente la variation maximale et la couleur bleue la variation minimale. Les valeurs en abscisses et ordonnées correspondent aux pixels, 1 pixels=40µm. Les flèches blanches indiquent les zones pour lesquelles une activité calcique a été observée.

La table 7 résume les résultats obtenus. La première ligne indique les directions du courant d'air appliqué. Les différentes lignes correspondent aux différentes zones du TAG pour lesquelles a été enregistrée une activité calcique au moins une fois. Les croix indiquent que des signaux calciques ont été enregistrés. Les enregistrements ont été répétés environ trois fois pour chaque grillon et chaque direction de stimulation.

	0°			90°			270°			Contrôle		
Grillon 1 G1	X									X		
				X								
	X						X			X		
Grillon 2 G1	X	X		X	X		X			X		
	X											
	X									X		
	X									X	X	
	X			X	X		X			X	X	X
	X									X		
	X									X		
Grillon 3 G2	X	X										
				X								
	X											
	X											
Grillon 4 G2				X								
	X											
	X											
	X											
Grillon 5 G2	X	X										
	X	X										
Grillon 6 G3	X			X								
				X								
							X					
	X			X			X	X				
							X	X				
	X											

Table 7 : Tableau récapitulatif des réponses calciques obtenues chez les six grillons soumis aux différents traitements (les 3 directions de stimulation 0, 90, et 270° ainsi que le contrôle, sans courant d'air). Dans la première colonne sont indiqués le nom des grillons ainsi que le groupe auquel ils appartiennent. G1: grillons intacts, G2: sans information visuelle, G3: sans informations des centres supérieurs et G4: sans information visuelle ni information des centres supérieurs. Les enregistrements pour lesquels des signaux calciques ont été identifiés sont indiqués par une croix.

Nous avons observé que différentes zones du TAG ont été activées lors de stimulations sensorielles par un courant d'air. De plus un même stimulus sensoriel (de même direction) a généré une activité calcique au niveau de plusieurs zones du TAG. Enfin, une même zone du TAG a été activée par différentes directions de stimulation sensorielle (Table 7).

Afin de caractériser les réponses, deux paramètres ont été analysés : la latence et l'amplitude (= valeur maximale de Δ(F340/F380)) pour les différents traitements (G1-G4). L'amplitude de réponse apparaît significativement supérieure pour G2 (connectifs intacts et yeux couverts) que pour G1 (intacts) (test de Kruskal-Wallis : χ^2=10,4416, P<0.01 ; test de Behrens-Fisher : P<0.05). Aucune différence d'amplitude n'a été observée entre les autres groupes (Fig. 34A). Les réponses calciques ont été enregistrées avec une latence moyenne de 11 secondes (Fig. 34B). Aucune différence de latence n'a été observée entre les différents groupes (Kruskal-Wallis : χ^2=3,14, P=NS).

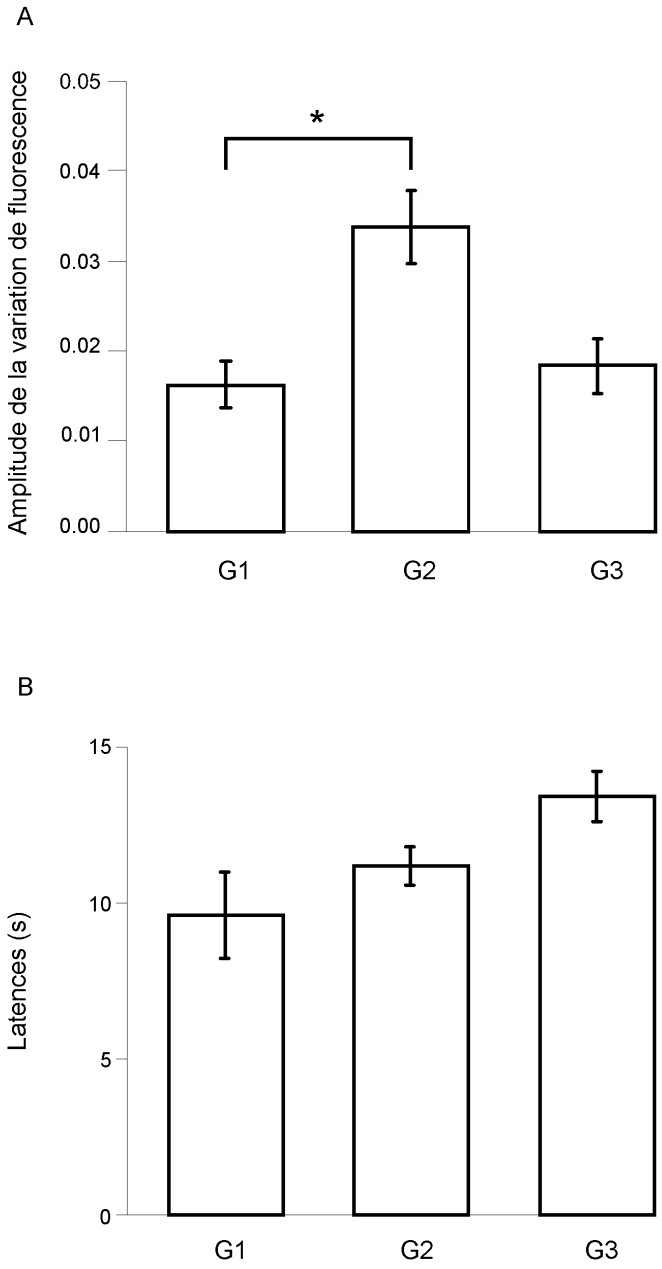

Figure 34 : Résultats des paramètres enregistrés pour les différents groupes de grillons. G1: grillons intacts, G2: grillons ayant les yeux couverts, G3: grillons ayant les connectifs coupés (A) Amplitude moyenne ± SEM des signaux calciques (= valeur maximale de Δ(F340/F380)) déclenchés par une stimulation sensorielle. Test de Behrens-Fisher, *: P<0,05. (B) Latence moyenne ± SEM des signaux.

Discussion

Des réponses calciques au niveau du ganglion abdominal terminal ont pu être enregistrées sur des grillons entiers de l'espèce *N. sylvestris.* Ces réponses calciques ont été observées à différentes localisations du ganglion et présentent une taille d'environ 37,19 µm. Une même stimulation peut générer l'activation de plusieurs zones. Une même zone s'est

activée pour différentes stimulations. Les grillons dont les yeux ont été inactivés présentent des réponses d'une amplitude supérieure à celle de grillons intacts. Les réponses calciques apparaissent environ 11 secondes après le début de la stimulation sensorielle.

Caractéristiques de la préparation

Notre préparation des grillons *N. sylvestris,* qui sont nettement plus petits que les espèces classiquement utilisées, nous a permis d'obtenir des enregistrements reproductibles de l'activité calcique. Ces enregistrements ont été obtenus sur des grillons entiers. Notre préparation est moins invasive que celles habituellement utilisées, pour lesquelles le ganglion et les cerques sont isolés. Afin de pouvoir enregistrer des réponses en imagerie calcique, il est nécessaire d'avoir un très bon accès au ganglion, ce qui impose de retirer beaucoup de tissus en surface du ganglion. Il est donc possible que des nerfs de petits diamètres arrivant au ganglion aient été endommagés durant la préparation. Toutefois un grand soin a été apporté afin de préserver les nerfs cerquaux ainsi que les connectifs (hormis lors des expériences de lésion des connectifs comme indiqué précédemment). Notre préparation nous a permis d'enregistrer des réponses calciques reproductibles dans des conditions plus proches des conditions naturelles que les préparations classiques.

Le marquage des cellules

Afin d'enregistrer l'activité globale du ganglion, nous avons marqué l'ensemble des neurones du ganglion. Cela est possible par l'utilisation de colorants associés à des molécules d'acetocymethyl (AM) ester appliquées en bain. La molécule AM permet au colorant de traverser les membranes plasmiques et donc d'entrer dans toutes les cellules. Ainsi à la foi les axones des neurones sensoriels, les interneurones locaux et l'ensemble des interneurones quittant le ganglion ont été marqués. De plus, nous espérions, en enregistrant l'activité calcique à la fois au niveau pré et post-synaptique, augmenter la quantité de fluorescence. Nous avons, en effet, obtenu des réponses suffisamment intenses et discrètes. Aucune analyse anatomique détaillée n'ayant été réalisée, sur chaque individu après les expériences physiologique, l'identification précise des zones d'activité s'avère difficile. Toutefois, les données anatomiques disponibles (Insausti et al., 2008) sur le TAG de *N. sylvestris* nous permettent d'établir que cette activité calcique se produit très probablement au niveau des

corps cellulaires des interneurones géants. En effet, la taille des corps cellulaires des interneurones géants est environ de 20 à 50 µm, et ces corps cellulaires sont plutôt localisés à la périphérie du ganglion (Insausti et al., 2008). La taille de nos zones d'activité d'environ 37 µm correspond à celle des corps cellulaires des IGNs. De plus, les zones d'activité sont majoritairement sur les parties externes de la fenêtre d'enregistrement. Nous pouvons supposer que les zones d'activité enregistrées correspondent à des corps cellulaires. Toutefois, des mesures anatomiques sur chaque individu seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

La latence de réponse

Bien que notre préparation nous ai permis d'obtenir des variations de calcium intracellulaire chez *N. sylvestris,* ces résultats s'avèrent difficiles à interpréter dans le cadre des processus que nous étudions. En effet la dynamique de l'activité calcique que nous avons enregistrée est très lente (environ 11 s) et ne peut pas être impliquée dans des processus permettant de déclencher des réponses de fuite à l'attaque de prédateurs. Lors d'études réalisées sur les blattes, des réponses nerveuses ont été obtenues au niveau des interneurones géants avec une latence d'environ 8,5 ms (Libersat et al., 2005). De plus, les enregistrements de variation de calcium réalisés par Ogawa, présentés en introduction, montrent que l'augmentation de calcium apparaît 5 à 10 ms après le potentiel d'action. Les résultats des expériences d'enregistrement de l'activité nerveuse au niveau du connectif présenté en troisième partie de ce travail montrent que le maximum d'activité se produit 0.30s après le déclenchement du piston pour une vitesse de piston de 15 cm/s. Ce mécanisme est donc plus rapide que celui que nous avons observé. Finalement, l'augmentation de calcium étudiée par Ogawa se produit au niveau des terminaisons dendritiques ou axoniques. Nos résultats suggèrent que la variation de colorant que nous observons se produit, elle, au niveau des corps cellulaires. L'augmentation de Ca^{2+} que nous observons n'est donc pas similaire à celle observée par Ogawa et al.

Des réponses nerveuses aussi lentes pourraient être expliquées par une activation d'une autre modalité sensorielle n'étant pas directement impliquée dans le déclenchement de la fuite du grillon, plus lente. Une des modalités particulièrement stimulée lors d'enregistrements optophysiologiques est la vision, puisque de fortes lumières sont envoyées pour stimuler les colorants. D'autre part, toute information rétrograde retournant au ganglion

présenterait un délai important. Afin de tester ces hypothèses, différents traitements ont été réalisés. Des lésions des connectifs ont été réalisées afin d'éliminer toute information rétrograde, et les yeux des grillons ont été recouverts par de la peinture noire, afin de supprimer toute information visuelle. Ces expériences n'ont apporté que peu d'indications sur l'origine de cette augmentation du calcium dans les cellules. Une augmentation de l'amplitude des signaux a été observée lors de la suppression des informations visuelle suggérant une potentielle inhibition générée par les informations visuelles.

Le calcium est ubiquitaire et impliqué dans une variété très large de mécanismes cellulaires (Berridge, 1998). De nombreux processus ayant un rôle biologique pertinent et étant régulés par le calcium sont connus tels que la production d'ATP, le traitement des protéines, et l'expression de gènes. D'autre part des mécanismes spécifiques des neurones et sensibles au calcium sont également connus comme la libération de neurotransmetteur, la génération de potentiels d'actions et la croissance de neurites (Friel, 2003). Ces mécanismes présentent un décours temporel très variable ; certains comme la libération de neurotransmetteur et la génération de potentiels d'actions sont très rapides, d'autres sont plus lents comme l'expression de gène, le traitement des protéines ou la croissance de neurites. Les cellules gliales sont également présentes dans le tissu nerveux. De fortes variations de concentration de calcium intracellulaire ont été observées dans ces cellules. De plus une augmentation de calcium intracellulaire a été enregistrée au cours d'expériences sur la communication intercellulaire présentant un délai de plusieurs secondes (Charles, et al., 1991). De nouvelles expériences seront nécessaires pour identifier plus précisément à quoi correspond cette entrée de calcium dans les cellules déclenchée par la stimulation méchanosensorielle.

DISCUSSION GENERALE

Le système des cerques est étudié depuis plus de 50 ans chez le grillon et la blatte. Malgré cela, les aspects écologiques du fonctionnement de ce système (par exemple l'environnement, les caractéristiques physiques des stimulations) n'ont été que très peu pris en compte dans ces travaux. *Nemobius sylvestris* représente un modèle d'exception dans l'étude du système des cerques car différents acteurs sont étudiés. Ceux-ci comprennent les poils filiformes, le système nerveux, les prédateurs, les caractéristiques physiques des courants d'air générés par l'attaque du prédateur et l'environnement proche. Ainsi, l'intégration des connaissances concernant l'ensemble des intervenants et l'utilisation de stimuli adéquats, permettront de comprendre plus précisément les capacités de perception du système sensoriel cercal. Comme nous l'avons vu en introduction, de nombreux et divers animaux sont prédateurs des grillons. Ces différents animaux génèrent des flux d'air très variés : certains sont oscillatoires, comme ceux générés par des insectes volants et d'autres sont non-oscillatoires, comme ceux créés par une araignée qui court ou par le déploiement de la langue chez les amphibiens. Au risque de trop complexifier le cadre de travail, il n'était pas possible d'intégrer tous les paramètres des différents types de stimulations (oscillatoires et non-oscillatoires), nous nous sommes donc restreints aux stimuli non-oscillatoires, le grillon étudié étant principalement attaqué par des araignées. D'autre part, on sait que chez ces animaux, le comportement de fuite est déclenché par la détection de mouvements d'air, ainsi que par un contact avec les cerques (Dangles et al., 2007). Les poils filiformes, détecteurs de mouvements d'air, étant les récepteurs auxquels nous nous sommes intéressés, nous avons donc considéré dans ce travail la détection du prédateur par la détection du mouvement d'air.
Dans ce travail de thèse nous avons réalisé à la fois des expériences comportementales et de neurobiologie, chaque type d'expérience ayant apporté de nouvelles informations sur le fonctionnement du système sensoriel cercal.

L'étude comportementale nous montre que :

- La détection de l'attaque est bien sûr nécessaire mais n'est pas suffisante pour assurer une fuite efficace.
- Les grillons fuient dans la direction opposée à celle de l'attaque. Le mouvement de rotation lors d'attaques de face, génère une perte de temps qui diminue l'efficacité de la fuite. Les grillons sont en conséquence moins efficaces dans l'évitement d'une attaque de face que de l'arrière.

- Les cerques sont très importants dans la détection de l'attaque. Toutefois, la capacité de fuite résiduelle non négligeable en l'absence des cerques (48% des grillons détectent l'attaque et 24% fuient l'attaque) montre que d'autres poils sensoriels ou d'autres organes sensoriels seraient impliqués dans la détection de l'attaque.
- Les yeux et les antennes ne semblent pas impliqués dans la détection de l'approche d'un objet, leur inactivation n'ayant pas ou seulement très peu modifié la capacité de détection et de fuite des grillons.

Nous avons pu enregistrer l'activité nerveuse à la sortie du TAG, sur des grillons libres et dans leur milieu naturel bruité, ainsi qu'en laboratoire, dans un milieu contrôlé. Ces enregistrements nous ont permis d'observer que :

- Le système sensoriel cercal perçoit le bruit de fond (vent atmosphérique).
- La présence de bruit de fond en milieu naturel génère une diminution de l'activité nerveuse en réponse à une attaque.

L'étude optophysiologique de la dernière partie de cette thèse n'a malheureusement pas permis d'étudier le codage spatial des informations mécanosensorielles provenant des cerques. Nous avons tout de même enregistré et observé de l'activité calcique. Cette activité est cependant trop lente pour être à l'origine d'un comportement de fuite qui se doit d'être très rapide. Toutefois, nous avons développé un logiciel permettant d'analyser des données obtenues par des techniques optophysiologiques.

Nous avons présenté, en introduction, l'importance de l'écologie et de l'environnement dans la détection de l'attaque d'un prédateur, et dans le comportement de fuite. Nous pouvons à présent compléter le schéma de ces interactions. Nous avons en effet au cours de ce travail de thèse, montré un effet des facteurs abiotiques, et plus précisément du bruit de fond, sur le codage neuronal de l'information (Fig. 35 (7)). De plus, d'autres organes semblent être impliqués dans la détection de l'attaque et nous avons observé qu'ils permettent un comportement de fuite en l'absence des cerques (Fig. 35 (8)). Enfin, nous avons pu constater que l'efficacité de la fuite varie fortement en fonction de la direction d'attaque (Fig. 35 (9)).

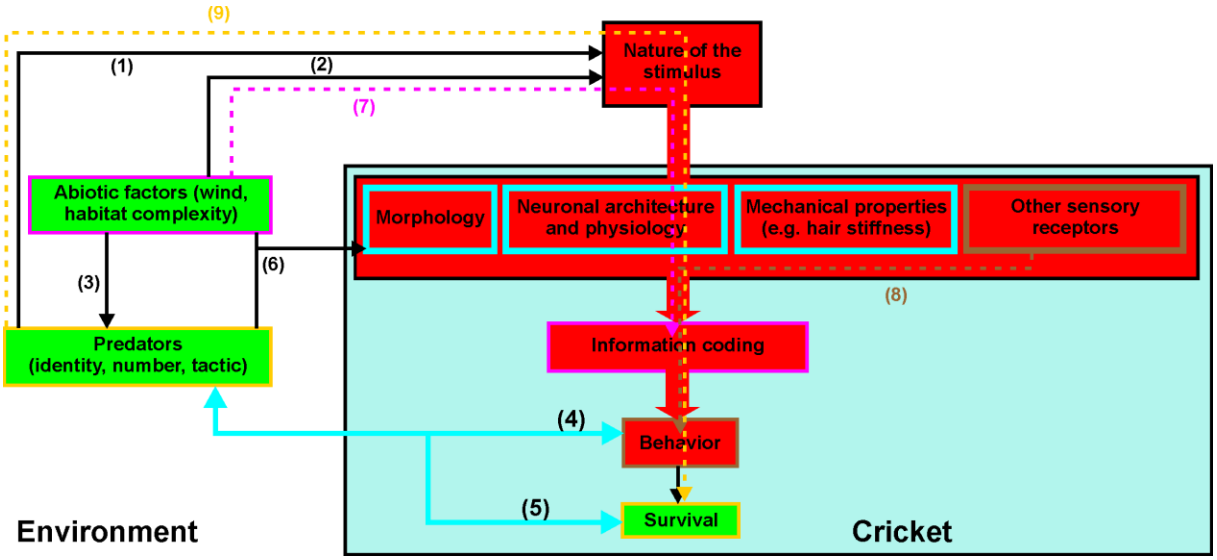

Figure 35 : L'importance du cadre écologique dans la compréhension du système de fuite du grillon. (1) L'identité des prédateurs affecte la nature du stimulus perçu par le grillon. (2) L'importance relative d'un stimulus peut être fortement affectée par la qualité de sa transmission dans l'environnement local. La perception du signal a été rattachée au type d'habitat chez les chauves souris et les poissons mais cela n'a pas été documenté chez le grillon. Le bruit de fond peut également perturber la capacité des grillons à extraire les informations des stimuli. (3) Les tactiques de chasse des prédateurs du grillon peuvent être influencées par l'environnement comme cela a été montré pour d'autres prédateurs. (4) Le comportement et la survie des grillons varient en fonction de l'identité des prédateurs et de leurs tactiques d'attaques. En retour, le comportement des grillons peut influencer les tactiques des prédateurs. (5) La morphologie des cerques du grillon est variable parmi les populations de différents environnements (Dangles et al., 2005). (6) Ceci suggère fortement une influence des prédateurs et/ou des caractéristiques de l'environnement sur la morphologie des cerques et une capacité de ceux-ci à répondre à des pressions de sélection. (7) Le bruit de fond génère une modulation de l'activité des interneurones ascendants. (8) En l'absence des cerques, 48% des grillons détectent l'objet en mouvement et 24% évitent le contact avec l'objet. (9) Les grillons fuient plus efficacement une attaque de l'arrière qu'une attaque de face. Modifié d'après Dangles et al. (2006a).

De l'écologie au système nerveux

L'étude d'un système sensoriel dans le cadre de l'écologie sensorielle nécessite l'intégration de données comportementales, physiques, physiologiques et d'évolution (Dusenbery, 2001). Dans ce contexte, l'équipe dirigée par J. Casas a réalisé plusieurs études sur les cerques et le comportement de fuite. Elle s'est attachée à observer entre autres les différences anatomiques de différentes populations de grillon de la même espèce *N. sylvestris* (Dangles et al., 2005), les prédateurs (Dangles et al., 2006a) et les caractéristiques aérodynamiques de leur attaque (Casas et al., 2008). Tous ces éléments sont directement liés à

l'environnement et donc à l'écologie et influencent la perception. Toutefois, un domaine dans lequel l'écologie a du mal à s'intégrer est la neurobiologie. Les expériences se font généralement dans des conditions de laboratoire extrêmement bien contrôlées. En effet, se placer dans un environnement naturel complexifie l'étude et apporte une certaine variabilité dans les conditions expérimentales. Dans le cas du système sensoriel cercal du grillon, un seul travail a été réalisé en milieu naturel par Gnatzy et Heuβlein en 1986. Dans cette étude, ils ont enregistré l'activité des neurones des connectifs (entre le TAG et l'avant dernier ganglion) d'*Acheta domesticus* lors de l'attaque d'une guêpe parasitoïde. Ils ont pu mesurer la distance à laquelle la guêpe est perçue ainsi que le rôle joué par les cerques et les antennes dans le déclenchement de la réponse de défense. Nous avons, dans ce travail de thèse, étudié l'activité nerveuse du système sensoriel cercal sur des grillons libres et en conditions naturelles.

1. La perception du bruit de fond

L'augmentation de l'activité de certains interneurones lors de l'exposition à un bruit de fond nous permet de savoir que le système perçoit le bruit de fond. Il n'y a donc pas une spécificité des poils filiformes aux stimulations pertinentes qui permettrait aux poils et aux interneurones de ne répondre qu'à celles-ci. Nous montrons ici que non seulement les poils, mais également les interneurones ascendants, répondent aux stimuli des attaques et également au bruit de fond. L'observation de réponses différentes entre les interneurones face au bruit de fond (les unités 1, 2 et 3 étant excitées et les unités 4, 5, 6 ne répondant pas) sous-entend que le système est capable de discriminer ces deux types de stimulations. Plummer et Camhi (1981) ont montré chez les blattes l'importance de l'accélération dans la discrimination entre le bruit de fond et un stimulus pertinent. D'autre part, toujours chez la blatte, il a été observé que les réponses des interneurones varient en fonction du spectre fréquentiel du stimulus (Rinberg et Davidowitz, 2000). Une des caractéristiques aérodynamiques d'un prédateur qui attaque en courant est l'augmentation de la vitesse du courant d'air au fur et à mesure qu'il s'approche (Casas et al., 2008). De plus, des études sur l'ensemble des poils montrent que ceux-ci interagissent (Cummins et al., 2007). Ainsi l'ensemble de ces informations amène à penser que la reconnaissance des caractéristiques d'un signal pertinent qui vont le distinguer du bruit de fond doit probablement faire intervenir plusieurs paramètres (le spectre fréquentiel, l'accélération, la vitesse). C'est donc probablement l'intégration de l'information

provenant de l'ensemble des poils au niveau du TAG qui doit permettre cette distinction entre bruit de fond et attaque d'un prédateur.

De nombreuses études restent à faire sur le fonctionnement des poils qui n'est pas à ce jour bien compris.

2. *Gestion du bruit de fond*

Nous avons, au cours de ce travail de thèse, analysé comment le système mécanosensoriel cercal gère la présence de bruit de fond. Nous avons observé un mécanisme de modulation des réponses nerveuses aux stimulations mimant l'attaque d'un prédateur, en présence de bruit de fond. De plus, le codage de l'intensité du stimulus (c'est-à-dire la vitesse de l'objet) est maintenu au cours de la modulation nerveuse. Plus intéressant encore, la modulation est fonction de l'intensité de la stimulation. Enfin, nos résultats ne montrent pas de modification de la sensibilité. En effet, pour des stimulations de faible intensité (i.e. 5 et 15 cm/s), la fréquence d'activité est la même en présence ou non de bruit de fond. Nous n'observons pas, dans le cas des petites intensités de stimulation, de modulation de la réponse nerveuse par le bruit de fond. Ceci est probablement la conséquence de la variation de la modulation en fonction de l'intensité de stimulation.

Des mécanismes de modulation tels que l'adaptation, déjà décrits en laboratoire dans différents systèmes sensoriels (la vision, l'olfaction, l'audition, l'électroréception, la mécanoréception (Torre et al., 1995; Laughlin, 1989; Ronacher et hennig, 2004; Benda et al., 2005; Clague et al., 1997) jouent un rôle très important dans la gestion de la variabilité de l'intensité des stimuli, en particulier du bruit ambiant. Comme nous l'avons traité dans la troisième partie, les données que nous avons obtenues ne nous permettent pas de conclure précisément sur le type de mécanisme observé. De nouvelles expériences seront nécessaires afin de savoir si cette modulation fait partie des mécanismes d'adaptation.

3. *Hypothèse sur le mécanisme de modulation de l'activité nerveuse*

Nous avons élaboré une hypothèse sur les interactions nerveuses pouvant faire émerger le mécanisme de modulation que nous avons observé. La figure 36 présente, sous forme de schéma, cette hypothèse.

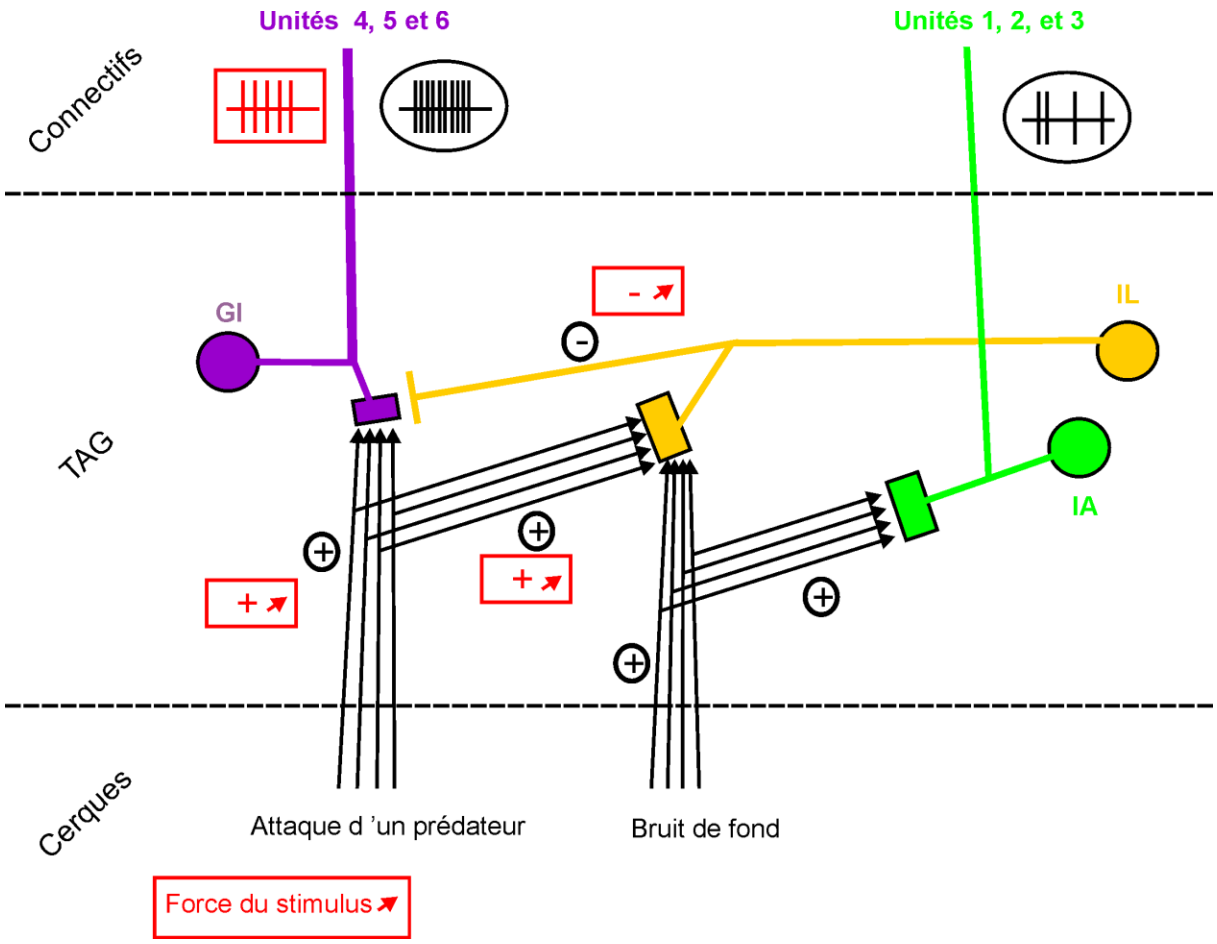

Figure 36 : Schéma de l'interaction neuronale au niveau du TAG générant la modulation de la fréquence de l'activité enregistrée au niveau des connectifs. L'attaque d'un prédateur active un ensemble de poils et donc un ensemble de neurones sensoriels au niveau des cerques. La projection des neurones sensoriels au niveau du TAG va permettre l'extraction d'information sur le stimulus (direction, fréquence…) et l'activation d'interneurones particuliers. L'attaque du prédateur va activer l'interneurone géant (GI) et l'interneurone local (IL). Le bruit de fond va déclencher l'activation de l'IL et d'un interneurone ascendant (IA). L'IL activé par l'attaque du prédateur et le bruit de fond, inhibe le GI. Plus le stimulus de l'attaque du prédateur est puissant, plus l'IL est excité et plus il inhibe le GI.

Nous avons observé que les neurones des unités 1 à 3 répondent au bruit de fond. Les interneurones des unités 4 à 6 sont, eux, excités par les stimulations sensorielles de l'attaque. En milieu bruité, ces mêmes interneurones (des unités 4 à 6) répondent toujours aux stimulations sensorielles mais la fréquence des potentiels d'action est diminuée comparée à celle observée en milieu non bruité. Plus la stimulation sensorielle de l'attaque est forte (de plus grande vitesse) plus la diminution de la fréquence des potentiels d'action est importante. A partir de ces faits, nous pouvons supposer que des interneurones locaux excités par le bruit

de fond et par la stimulation sensorielle vont inhiber les interneurones (des unités 4 à 6) et produire une inhibition qui sera proportionnelle à la force du stimulus pertinent (Fig. 36).

A notre connaissance, c'est la première fois qu'un mécanisme de modulation de l'activité nerveuse par le bruit de fond est observé en milieu naturel dans le cadre de la mécanoréception. Les résultats obtenus ne permettent cependant pas de déterminer précisément le rôle de cette modulation. Nous pouvons toutefois supposer que celle-ci permettrait d'éviter une saturation des neurones, leur permettant ainsi de répondre à de nouvelles stimulations malgré la présence d'un très fort bruit de fond. Ce type d'hypothèse a déjà été élaboré au sujet de l'adaptation (Harris et al., 2000).

Afin de valider ces hypothèses, de nouvelles expériences seront nécessaires. Des enregistrements intracellulaires devront être réalisés afin de confirmer les interactions et l'effet inhibiteur des interneurones locaux.

Le rôle des cerques

La présence de neurones géants dans le système cercal nous a amené à penser que ce système est impliqué dans le déclenchement et l'orientation de la fuite lors de l'attaque de prédateurs. En effet, les GINs permettent grâce à leurs axones géants, de transporter rapidement l'information pour déclencher la fuite. De nombreuses expériences ont confirmé le rôle très important des cerques dans ce comportement (Camhi et al., 1978, Gras et Horner, 1992). Toutefois, limiter les cerques à cette seule fonction est très réducteur. Les poils filiformes des cerques sont communément décrits comme des récepteurs de mouvements d'air dans l'environnement proche. Quelles sont plus précisément les fonctionnalités de ce système sensoriel cercal ?

Les grillons semblent utiliser leurs cerques pour la perception du chant des individus conspécifiques, et pour la perception globale de l'environnement proche (Kämper et Dambach, 1985).

Outre les GINs, d'autres interneurones sont présents au niveau du TAG tels que les interneurones non-géants ainsi que les interneurones locaux. Les interneurones non-géants ont été très peu étudiés et leur rôle n'est pas décrit. On sait toutefois qu'ils répondent au son (Kamper, 1984) ainsi qu'aux mouvements d'air et sont connectés aux voies motrices (Baba et al., 1991). De plus, ces interneurones non-géants présentent une sensibilité spécifique à la direction du courant d'air. L'étude anatomique réalisée chez *N. sylvestris* par Insausti et al.

(2008) montre la présence d'un très grand nombre d'interneurones non-géants dans les connectifs.

L'enregistrement global de l'activité nous a permis d'enregistrer l'activité nerveuse en réponse aux mouvements d'air du bruit ambiant ainsi que de l'activité en réponse au déplacement du piston mimant l'attaque d'un prédateur. Le système mécanosensoriel cercal est donc capable de percevoir le bruit de fond, renforçant ainsi l'idée selon laquelle les cerques pourraient permettre une perception globale de l'environnement. Nous pouvons supposer, dans ce cas, que les petits neurones seraient impliqués dans cette perception globale et générale de l'environnement, cette information ne nécessitant pas d'être transportée très rapidement. Cette idée est renforcée par le fait que ce sont les unités 1 à 3 (unités probablement de petits diamètres) qui dans nos expériences répondent au bruit de fond. Nous pouvons supposer cependant que les informations globales sur l'environnement proche subissent plus de traitement, et sont intégrés avec des informations provenant d'autres modalités sensorielles. L'étude anatomique de la projection de ces petits interneurones ascendants pourrait donc compléter ces hypothèses.

Un des rôles principaux des cerques est toutefois le déclenchement de la fuite. Nous allons à présent nous pencher sur ce comportement de manière plus générale.

Comportement inné et plasticité

L'ensemble des informations recueillies sur le comportement de fuite depuis que celui-ci est étudié vont nous permettre de considérer ce comportement d'un point de vue plus général. Ce comportement se doit d'être rapide, efficace et fiable afin de permettre la survie de l'insecte. Est-ce donc un réflexe fixe et inné ? Un comportement inné est porté par les gènes et retrouvé chez tous les individus d'une espèce. Parmi les comportements innés on trouve le comportement réflexe. Un réflexe est une réaction motrice automatique et involontaire à un stimulus (Brodal, 2004). Les réflexes sont impliqués dans différentes fonctions comme la posture, l'évitement d'un danger … Ce dernier comprend par exemple le réflexe de flexion qui permet le retrait de la main lors d'un contact avec une source de chaleur, ou le comportement de fermeture des paupières lors d'un contact avec la cornée. Les réflexes sont également décrits chez les insectes, entre autre dans le maintien de la position (Chapman, 1998). Au vu de ces informations et définitions, le comportement de fuite pourrait

être considéré comme un comportement inné et réflexe. Le réflexe serait un déclenchement de la fuite et de l'activité des pattes lors de la stimulation des cerques par un courant d'air.

Le comportement de fuite est observé chez les larve, comme nous l'avons observé dans nos expériences (cf. deuxième partie), elles sont capables d'échapper aux prédateurs dès leur naissance, sans avoir besoin au préalable d'acquérir ce comportement par l'apprentissage (Kämper, 1992). Le comportement de fuite est donc un comportement inné.

Plusieurs éléments nous amènent à penser que le système sensoriel à la base de ce comportement et le comportement lui-même n'est pas un simple réflexe. Tout d'abord, la réponse de fuite n'est pas stéréotypée (c'est-à-dire invariable) : les grillons vont adapter la réponse au stimulus, ils s'immobilisent si un prédateur s'approche en volant (Gnatzy, 1996), ils s'enfuient lors de l'approche d'un prédateur qui court comme une araignée (cf deuxième partie ; Dangles et al., 2006b), et vont réaliser des ruades lorsque qu'une guêpe parasitoïde touche les cerques (Dumpert et Gnatzy, 1977; Hustert et Gnatzy, 1995). D'autre part, ce comportement peut être modulé dans différentes conditions comme nous l'avons expliqué en introduction. L'état physiologique, le statut social ou encore la présence d'une femelle, font varier la réponse de fuite. Ce comportement est également variable en fonction du stade de développement. En effet, nos expériences (cf. deuxième partie) ainsi que celles de Dangles et al. (2007) montrent que les adultes ont un taux de réponse de fuite plus faible que les juvéniles. Lors de l'ablation des cerques, 48% des grillons ont déclenché un comportement de fuite (cf. deuxième partie). Il semble donc que d'autres modalités ou d'autres poils localisés sur le reste du corps soient impliqués. Les yeux et les antennes ne semblent pas jouer de rôle dans le déclenchement de ce comportement, toutefois peut être prennent-ils le relai lorsque les cerques sont inactivés. Ce comportement semble donc ne pas être déclenché seulement par les cerques.

Au niveau neuronal l'analyse et le traitement de l'information mécanosensorielle passe par des mécanismes faisant intervenir tout un réseau de neurones et ce réseau ainsi que son activité peuvent être modulés (cf. introduction, p. 32). Le système cercal n'est donc pas simple et linéaire comme peuvent l'être des voies supportant des mécanismes réflexes.

Ce comportement bien qu'assez constant n'est donc pas fixe puisqu'il peut être modulé en fonction des conditions rencontrées par les grillons. Ce comportement est donc bien inné mais n'est pas un réflexe.

Les conditions expérimentales

Nous avons tout au long de ce travail de thèse essayé de rester au plus proche des conditions naturelles du grillon, que ce soit pour les expériences de comportement, d'électrophysiologie et d'imagerie calcique. Bien entendu chaque technique apporte ses contraintes et ses limites, toutefois nous avons pu utiliser des insectes entiers pour toutes les expériences. Ceci nous a permis de conserver toutes les connections nerveuses et donc les potentielles interactions entre organes et avec les centres supérieurs comme le cerveau. L'utilisation du piston nous a permis de distinguer la détection et la fuite efficace. Nous avons ainsi pu observer des différences de performances en fonction de l'angle d'attaque. Ces variations peuvent avoir un rôle important dans la relation entre la proie et le prédateur, en particulier les tactiques d'attaque de ce dernier. Les différences de performances constatées entre nos résultats et ceux obtenus avec des puffs d'air renforcent l'intérêt d'utiliser des conditions appropriées pour l'étude de ce comportement mais aussi dans l'étude du système nerveux le supportant. En ce qui concerne l'étude de l'activité nerveuse, nous avons mis en place une préparation permettant d'enregistrer cette activité nerveuse sur des grillons libres en milieu naturel. Cette technique nous a donné des résultats intéressants et ouvre la porte a d'innombrables possibilités.

Perspectives

1. *Plus vrai que nature*

Une des possibilités que donne notre préparation électrophysiologique est de pouvoir enregistrer l'activité nerveuse lors de l'attaque d'un prédateur naturel, l'araignée loup. Nous avons pu enregistrer l'activité au niveau des connectifs à la sortie du TAG sur des grillons libres dans leur milieu naturel lors de l'attaque d'araignées. Nous avons obtenu 14 enregistrements à la fois électrophysiologiques et comportementaux de ces attaques. La synchronisation des deux types de données (électrophysiologiques et vidéos) nous permet d'observer le moment où la perception a lieu comme le montre la figure 37. Les premières analyses réalisées sur ces données montrent des réponses nerveuses lors de l'approche de l'araignée et avant que celle-ci ait touché le grillon.

Ces données vont nous permettre de déterminer la distance à laquelle l'araignée est perçue et ainsi de pouvoir la comparer à celle obtenue avec le piston. Des études portant sur l'aérodynamisme de l'attaque de l'araignée semblent indiquer que 20% du mouvement d'air généré par l'araignée lors de sa course, provient du mouvement des pattes (hypothèse non publiée). Nous allons ainsi pouvoir confronter cette hypothèse à nos données. En effet, nous connaissons à présent la vitesse de courant d'air générant une réponse maximale. Si la distance à laquelle est observée la réponse maximale est plus petite que celle attendue par rapport à la position du corps de l'araignée, nous pourrons alors supposer que les pattes ont joué un rôle non négligeable dans la production du courant d'air. Une analyse plus fine des réponses lors de l'attaque de l'araignée permettrait d'obtenir un profil temporel précis de l'activité des interneurones pendant l'attaque d'un prédateur. Ce type d'analyse demande des méthodes mathématiques élaborées.

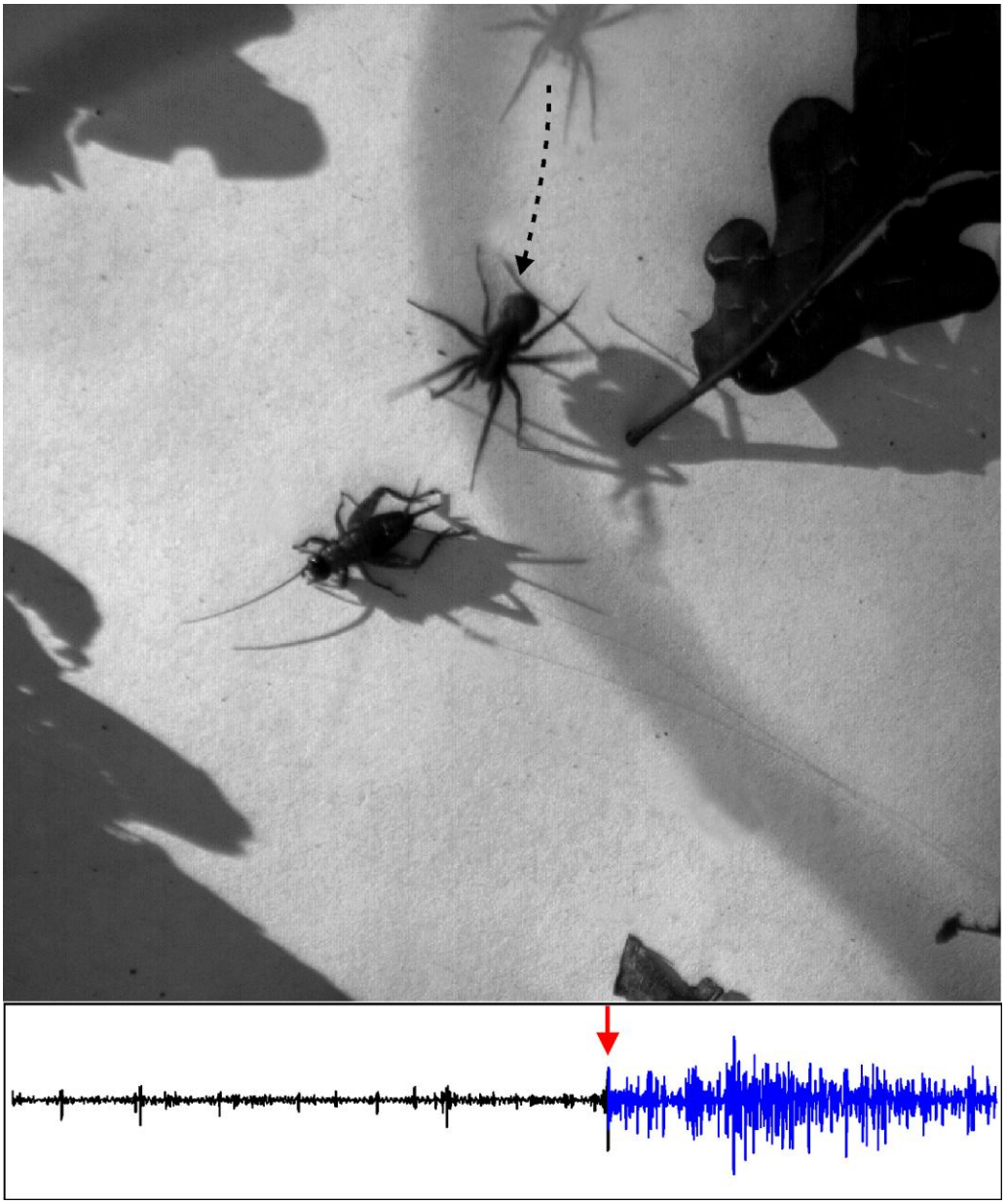

Figure 37 : Instantané et enregistrement électrophysiologique de l'activité nerveuse à la sortie du TAG lors de l'attaque d'une araignée. Le tracé représente l'activité nerveuse au cours du temps et l'instantané correspond au moment indiqué par la flèche rouge. Le tracé noir correspond à l'activité enregistrée avant le moment de l'instantané, et le tracé bleu l'activité enregistrée après. Le parcours de l'araignée est représenté par la flèche en pointillés dont le début est indiqué par l'araignée grise.

2. Analyse des unités

L'étape suivante et nécessaire à l'analyse de la réponse des interneurones en milieu naturel sera de déterminer précisément quels neurones appartiennent aux unités distinguées dans ce travail. Il nous faudra, pour une meilleure compréhension du codage de l'information

et de la discrimination entre bruit de fond et signaux pertinents, analyser les réponses individuelles. Afin d'enregistrer à la fois l'ensemble des interneurones et pouvoir analyser indépendamment les réponses de chaque neurone, deux électrodes devront être implantées à deux niveaux différents de la chaine ventrale. En effet, les réponses nerveuses de neurones de diamètres différents varient par l'amplitude des potentiels d'action ainsi que par la vitesse de propagation. L'utilisation de deux électrodes permettra ainsi de mesurer la vitesse de propagation et donc de distinguer deux neurones dont l'amplitude est proche. Ces expériences apporteront plus de précisions : nous pourrons savoir plus précisément quels neurones répondent au bruit de fond et quels neurones sont particulièrement affectés par le mécanisme de modulation que nous avons observé.

Conclusion

Les relations étroites et complexes entre les caractéristiques de l'environnement, des récepteurs, du système nerveux etc. rendent difficile l'étude isolée de l'un de ces acteurs. Nous avons dans ce travail, à la fois mis en place des expériences permettant d'étudier ce système en prenant en compte ces relations, mais aussi montré leurs influences et décrit leurs effets. Nous avons montré l'impact, entre autre, de l'environnement sur le codage de l'information sensorielle, par la perception du bruit de fond et l'induction d'un phénomène de modulation de l'activité nerveuse. Nous avons aussi montré l'importance des cerques dans la détection de l'attaque par rapport aux autres organes sensoriels. Enfin, Nous avons pu différencier la détection du comportement de fuite, éléments qui chacun doivent être des plus efficaces pour permettre la survie.

Les mécanismes et les caractéristiques faisant du système sensoriel cercal l'un des plus sensibles du monde animal ne sont pas encore tous dévoilés. De plus, ce système doit être en constante amélioration afin que les prédateurs ne prennent pas l'avantage. La course à l'armement n'est jamais terminée.

BIBLIOGRAPHIE

Ashworth, R. & Bolsover, S.R. 2002. Spontaneous activity-independent intracellular calcium signals in the developing spinal cord of the zebrafish embryo. Brain Res Dev Brain Res, 139, 131-7.

Ashworth, R. 2004. Approaches to measuring calcium in zebrafish: focus on neuronal development. *Cell Calcium*, 35, 393-402.

Baba, Y., Hirota, K. & Yamaguchi, T. 1991. Morphology and response properties of wind-sensitive non-giant interneurons in the terminal abdominal ganglion of crickets. *Zoological Science*, 8, 437-445.

Baba, Y. & Shimozawa, T. 1997. Diversity of motor responses initiated by a wind stimulus in the freely moving cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zoological Science*, 14, 587-594.

Bacon, J.P. & Murphey, R.K. 1984. Receptive fields of cricket giant interneurones are related to their dendritic structure. *Journal of Physiology*, 352, 601-623.

Baden, T. & Hedwig, B. 2007. Neurite-specific Ca^{2+} dynamics underlying sound processing in an auditory interneurone. *Developmental Neurobiology*, 67, 68-80.

Bellman, H. & Luquet, G. 1995. *Guide des sauterelles, grillons et criquets d'europe occidentale*. Paris: Delachaux et Niestlé.

Benda, J., Longtin, A. & Maler, L. 2005. Spike-frequency adaptation separates transient communiation signals from background oscillations. *Journal of Neuroscience*, 25, 2312-2321.

Berridge, M.J. 1998. Neuronal calcium signalling. *Neuron*, 21, 13-26.

Beugnon, G., Mieulet, F. & Campan R. 1983. Ontogenese de certains aspects de l'orientation du grillon des bois. *Behavioural Processes*, 8, 73-86.

Biernacki, C., Celeux, G., Govaert, G. & Langrognet, F. 2006. Model-Based Cluster and Discriminant Analysis with the MIXMOD Software. *Computational Statistics and Data Analysis*, vol. 51/2, pp. 587-600.

Bodnar, D.A., Miller, J.P. & Jacobs, G.A. 1991. Anatomy and physiology of identified wind-sensitive local interneurons in the cricket cercal sensory system. *Journal of Comparative Physiology A*, 168, 553-564.

Borst, A. & Egelhaaf, M. 1992. In vivo imaging of calcium accumulation in fly interneurons as elicited by visual motion stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 4139-4143.

Brennan, C., Mangoli, M., Dyer, C.E. & Ashworth, R. 2005. Acetylcholine and calcium signalling regulates muscle fibre formation in the zebrafish embryo. *Journal of Cell Science*, 118, 5181-90.

Brodal, P. 2004. *The central nervous system: structure and function*. Oxford university press inc.

Brustein, E., Msarandi, N., Kovalchuk, Y., Drapeau, P. & Konnerth, A. 2003. « In vivo » monitoring of neuronal network activity in zebrafish by two-photon Ca^{2+} imaging. Pflugers Archiv, 446, 766-73.

Burrows, M. & Horridge, G.A. 1974. The organisationof inputs to motoneurons of the locust metathoracic leg. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 269, 49-94.

Camhi, J.M. & Tom, W. 1978. The escape behaviour of the cockroach Periplaneta Americana. I. Turning response to wind puffs. *Journal of Comparative Physiology*, 128, 193-201.

Camhi, J.M., Tom, W. & Volman, S. 1978. The escape behavior of the cockroach *Periplaneta americana*. II. Detection of natural predators by air displacement. *Journal of Comparative Physiology*, 128, 203-212.

Camhi, J.M. 1984. A case study in neuroethology: the escape system of the cockroach. In: *Neuroethology: Nerve Cells and the Natural Behaviour of Animals*. (Ed. by Camhi J.M.), Sunderlan: Sinauer Associates, pp. 79-105.

Campan, R. 1965. Etude du cycle biologique du grillon *Nemobius sylvestris* dans la region toulousaine. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse*, 100, 371-378.

Campan, R. & Gautier, J.Y. 1975. Orientation of the cricket *Nemobius sylvestris* (Bosc) towards forest-trees. Daily variations and ontogenetic development. *Animal Behaviour*, 23, 640-649.

Carlsson, M.A., Knüsel, P., Verschure, P.F. & Hansson, B.S. 2005. Spatio-temporal Ca^{2+} dynamics of moth olfactory projection neurones. *European Journal of Neuroscience*, 22, 647-57.

Casas, J., Steinmann, T. & Dangles, O. 2008. The aerodynamic signature of running spiders. *Plos One*, 3, e2116.

Chapman, R.F. 1998. *The insect structure and function*. Cambridge university press.

Charles, A.C., Merrill, J.E., Dirksen, E.R. & Sanderson, J.M. 1991. Intercellular signalling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*, 6, 983-992.

Chiba, A., Kämper, G. & Murphey, R.K. 1992. Response properties of interneurons of the cricket cercal sensory system are conserved in spite of changes in peripheral receptors during maturation. *Journal of Experimental Biology,* 164, 205-226.

Chopard, L. 1938. *La biologie des Orthoptères- Encyclopédie entomologique*. Paris : Paul Lechevalier.

Clague, H., Theunissen, F. & Miller, J.P. 1997. Effects of adaptation on neural coding by primary sensory interneurons in the cricket cercal system. *Journal of Neurophysiology*. 77, 207-220.

Comer, C.M. & Dowd, J.P. 1993. Multisensory processing for movement: antennal and cercal mediation of escape turning in the cockroach. In: *Biological neural networks in invertebrate neuroethology and robotics*. (Ed. by Beer, R.D., Ritzmann, R.E. & McKenna, T.), New York: Academic press, Inc, pp. 89-112.

Comer, C.M., Mara, E., Murphy, K.A., Getman, M. & Mungy, M.C. 1994. Multisensory control of escape in the cockroach *Periplaneta americana*. II Patterns of touch-evoked behavior. *Journal of Comparative Physiology A*, 174, 13-26.

Comer, C. & Leung, V. 2004. The vigilance of the hunted: mechanosensory-visual integration in insect prey. In: *Complex worlds from simpler nervous systems.* (Ed. by Prete, R.), MIT Press, pp. 313-334.

Coolen, I, Dangles, O. & Casas, J. 2005. Social learning in noncolonial insects? *Current Biology*. 15, 1931-1935.

Cohen, L.B., Keynes, R.D. & Hille, B. 1968. Light scattering and birefringence changes during nerve activity. *Nature,* 218, 438-41.

Cohen, L.B., Salzberg, B.M. & Grinvald, A. 1978. Optical methods for monitoring neuron activity. *Annual Review of Neuroscience*, 1, 171-82.

Crook, S., Miller, J.P. & Jacobs, G .A. 2002. Modeling frequency encoding in the cricket cercal sensory system. *Neurocomputing,* 44,769-773.

Cummins, B., Gedeon, T., Klapper, I. & Cortez, R. 2007. Interaction between arthropod filiform hairs in a fluid environment. *Journal of Theoretical Biology,* 247, 266-280.

Dangles, O., Magal, C., Pierre, D., Olivier, A. & Casas, J. 2005. Variation in morphology and performance of predator sensing system in wild cricket populations. *Journal of Experimental Biology*, 208, 461-468.

Dangles, O., Casas, J. & Coolen, I. 2006a. Textbook cricket goes to the field : the ecological scene of the neuroethological play. *Journal of Experimental Biology,* 209, 393-398.

Dangles, O., Pierre, D., Magal, C., Vannier, F. & Casas, J. 2006b. Ontogeny of air-motion sensing in cricket. *Journal of Experimental Biology*, 209, 4363-4370.

Dangles, O., Ory, O., Steinmann, T., Christides, J.-P. & Casas, J. 2006c. Spider's attack vs. cricket's escape: velocity modes determine success. *Animal Behaviour*, 72, 603-610.

Dangles, O., Pierre, D., Christides, J.P. & Casas, J. 2007. Escape performance decreases during ontogeny in wild crickets. *Journal of Experimental Biology*, 210, 3165-3170.

Davis, G.W. & Murphey, R.K. 1993. A role for postsynaptic neurons in determining presynaptic release properties in the cricket CNS: evidence for retrograde control of facilitation. *Journal of Neuroscience*, 13, 3827-3838.

Dimitrov, A.G., Miller, J.P., Aldworth, Z. & Parker, A.E. 2002. Spike patter-based coding schemes in the cricket cercal sensory system. *Neurocomputing*, 44-46, 373-379.

Dombeck, D.A., Khabbaz, A.N., Collman, F., Adelman, T.L. & Tank, DW. 2007. Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron*, 56, 43-57.

Dumpert, K. & Gnatzy, W. 1977. Cricket combined mechanoreceptors and kicking response. *Journal of Comparative Physiology A*, 122, 9-25.

Dupuy, F., Casas, J., Bagnères, A.G. & Lazzari, C. 2009. OpenFluo: A free open-souce software for optophysiological data analyses. *Journal of Neuroscience Methods*, 183, 195-201.

Dusenbery, D.B. 2001. Physical constraints in sensory ecology. In: *Ecology of sensing*. (Ed. by Barth, F.G. & Schmid, A.). Berlin: Springer Verlag, pp. 1-19.

Dyakonova,V.E. & Schürmann, F.W. 1999. Effects of serotonergic and opioidergic drugs on escape behaviors and social status of male crickets. *Naturwissenschaften*, 86, 435-437.

Edwards, J.S. 1971. Composition of an insect sensory nerve, the cercal nerve of the house cricket *Acheta domesticus*. *Proceedings of Electron Microscop Society of America*, 17, 248-249.

Edwards, J.S. & Palka, J. 1974. The cerci and abdominal giant fibres of the house cricket, *Acheta domesticus*. I. Anatomy and physiology of normal adults. *Proceedings of the Royal Society of London*, 185, 83-103.

Elyada, Y.M., Haag, J. & Borst, A. 2009. Different receptive fields in axons and dendrites underlie robust coding in motion-sensitive neurons. *Nature Neuroscience*, 12, 327-32.

Fetcho, J.R. & O'Malley, D.M. 1995. Visualization of active neural circuitry in the spinal cord of intact zebrafish. *Journal of Neurophysiology*, 73, 399-406.

Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Eisermann, B., Sachse, S., Devaud, J.M., Buchner, E. & Galizia, C.G. 2002. Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. *Current Biology*. 12, 1877-84.

Friel, D.D. 2003. Mitochondrial and ER calcium uptake and release fluxes and their interplay in intact nerve cells. In: *Understanding calcium dynamics experiments and theory.* (Ed. by Falcke, M. & Malchow, D.), Berlin: Springer Verlag.

Gabbutt, P.D. 1959. The bionomics of the wood cricket, *Nemobius sylvestris* (Orthoptera: Gryllidae). *Journal of Animal Ecology*, 28, 15-42.

Galizia, C.G., Joerges, J., Küttner, A., Faber, T. & Menzel, R. 1997. A semi-in-vivo preparation for optical recording of the insect brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 76, 61-69.

Galizia, C.G., Nägler, K., Hölldobler, B. & Menzel, R. 1998. Odour coding is bilaterally symmetrical in the antennal lobes of honeybees (*Apis mellifera*). *European Journal of Neuroscience*, 10, 2964-74.

Galizia, C.G., Menzel, R. & Hölldobler, B. 1999. Optical imaging of odor-evoked glomerular activity patterns in the antennal lobes of the ant *Camponotus rufipes*. *Naturwissenschaften*, 86, 533-37.

Galizia, C.G. & Vetter, R.S. 2005. Optical methods for analyzing odor-evoked activity in the insect brain. In: *Methods in insect sensory neuroscience.* (Ed. by Christensen, T.A.), CRC press, pp. 349-92.

Gnatzy, W. & Tautz, J. 1980. Ultrastructure and mechanical properties of an insect mechanoreceptor : stimulus-transmitting structures and sensory apparatus of the cercal filiform hairs of Gryllus. *Cell Tissue Research*, 213, 441-463.

Gnatzy, W & Heuβlein, R. 1986. Digger wasp against crickets. I. Receptors involved in the antipredator strategies of the prey. *Naturwissenschaften*, 73, 212-215.

Gnatzy, W. & Hustert, R. 1989. Mechanoreceptors in behaviour. In: *Cricket behaviour and neurobiology* (Ed by Huber, F., Moore, T.E. & Loher, W.), Ithaca, NY: Cornel Univ. Press. Pp. 198-226.

Gnatzy, W & Kämper, G. 1990. Digger wasp against crickets. II. An airborne signal produced by a running predator. *Journal of Comparative Physiology A*, 167, 551-556.

Gnatzy, W. 1996. Digger Wasp vs. Cricket: Neuroethology of a Predator-Prey Interaction. In: *Information Processing in Animals*. (Ed. by Fisher, G.) , Vol. 10. Stuttgart: Urban and Fischer Verlag.

Gras, H. & Hörner, M. 1992. Wind-evoked escape running of the cricket *Gryllus bimaculatus* I. Behavioural analysis. *Journal of Experimental Biology*, 171, 189-214.

Grimaldi, D. & Engel, M.S. 2005. *Evolution of the insects*. Cambridge University Press.

Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R.D., Gilbert, C.D. & Wiesel, T.N. 1986. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature*, 324, 361-4.

Haag, J., Denk, W. & Borst, A. 2004. Fly motion vision is based on Reichardt detectors regardless of the signal-to-noise ration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 16333-38.

Hansson, B.S., Carlsson, M.A. & Kalinovà, B. 2003. Olfactory activation patterns in the antennal lobe of the sphinx moth, *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Physiology A*, 189, 301-8.

Harris, R.A., O'Carroll, D.C. & Laughlin, S.B. 2000. Contrast gain reduction in fly motion adaptation. *Neuron*. 28, 595-606.

Hill, A.A.V. & Jin, P. 1998. Regulation of synaptic depression rates in the cricket cercal sensory system. *Journal of Neurophysiology*, 79, 1277-1285.

Hollander, M. & Wolfe, D.A. *Nonparametric Statistical Methods*. New York: John Wiley & Sons, 1973, pp. 15- 22.

Honegger, H.W. 1981. A preliminary note on a new optopotor response in crickets: antennal tracking of moving targets. *Journal of Comparative Physiology A*, 142, 419-421.

Hubbard, J.I., Llinás, R. & Quastel, D.M.J. 1969. Electrophysiological analysis of synaptic transmission. London: Edward Arnold LTD.

Hustert, R. & Gnatzy, W. 1995. The motor program for defensive kicking in crickets : performance and neural control. *Journal of Experimental Biology*, 198, 1275-1283.

Insausti, T.C., Lazzari, C.R. & Casas, J. 2008. The terminal abdominal ganglion of the wood cricket *Nemobius sylvestris*. *Journal of Morphology*, 269, 1539-1554.

Jacobs, G.A. & Miller, J.P. 1985. Functional properties of individual neuronal branches isolated in situ by laser photoinactivation. *Science*, 228, 344-346.

Jacobs, G.A., Miller, J.P. & Murphey, R.K. 1986. Integrative mechanisms controlling directional sensitivity of an identified sensory interneuron. J*ournal of Neuroscience*, 6, 2298-2311.

Jacobs, G.A. 1995. Detection and analysis of air currents by crickets. *BioScience*, 45, 776-785.

Jacobs, G.A. & Theunissen, F.E. 1996. Functional organization of a neural map in the cricket cercal sensory system. *Journal of Neuroscience*, 16, 769-784.

Jacobs, G.A. & Theunissen, F.E. 2000. Extraction of sensory parameters from a neural map by primary sensory interneurons. *Journal of Neuroscience*, 20, 2934-2943.

Jacobs, G., Miller, J.P. & Aldworth, Z. 2008.Computational mechanisms of mechanosensory processing in the cricket. *Journal of Experimental Biology*, 211, 1819-1828.

Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C.G. & Menzel, R. 1997. Representation of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature*, 387, 285-88.

Kämper, G. 1984. Abdominal ascending interneurons in crickets: responses to sound at the 30-Hz calling-song frequency. *Journal of Comparative Physiology A*, 155, 507-520.

Kämper, G. & Dambach, M. 1985. Low-frequency airborne vibrations generated by crickets during singing and aggression. *Journal of Insect Physiology*, 31, 925-929.

Kämper, G. 1992. Development of cricket sensory hairs: changes of dynamic mechanical properties. *Journal of Comparative Physiology A*,170, 49-55.

Kanou, M., Ohshima, M. & Inoue, J. 1999. The air-puff evoked escape behavior of the cricket *Gryllus bimaculatus* and its compensational recovery after cercal ablations. *Zoological Science*, 16, 71-79.

Kanou, M., Ureshi, M., Suematsu, Y. & Hirao, K. 2001. Changes in the escape eliciting system of a cricket revealed by sensory deprivation during postembryonic development. *Zoological Science*, 18, 791-796.

Kanou, M., Teshima, N. & Nagami, T. 2002. Rearing conditions required for behavioral compensation after unilateral cercal ablation in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Zoological Science*, 19, 403-409.

Kanou, M. & Kondoh, Y. 2004. Compensation of escape direction in unilaterally cercus-ablated crickets, *Gryllus bimaculatus*, is associated with the distance walked during recovery period. *Zoological Science*, 21, 933-939.

Kanou, M., Konishi, A. & Suenaga, R. 2006. Behavioral analyses of wind-evoked escape of the cricket, *Gryllodes sigillatus*. *Zoological Science*, 23, 359-364.

Kant, R. & Humphrey, J.A. 2009. Response of cricket and spider motion-sensing hairs to airflow pulsations. *Journal of The Royal Society Interface*, in press.

Keil, T.A. 1998. The structure of integumental mechanoreceptors. In *Microscopic anatomy of invertebrates.* (Ed. By Harrison, F.W. & Locke, M.), New York: Wiley J. & sons, pp. 385-404.

Killian, K.A., Snell, L.C., Ammarell, R. & Crist, T.O. 2006. Suppression of escape behaviour during mating in the cricket *Acheta domesticus*. *Animal Behaviour*, 72, 487-502.

Kurtz, R., Kalb, J. & Spalthoff, C. 2008. Examination of fly motion vision by functional fluorescence techniques. *Frontiers in Bioscience*, 13, 3009-21.

Lambin, M. 1985.Ontogenese de la fixation visuelle au cours de la marche orientée chez le grillon des bois *Nemobius sylvestris*. *Behavioural Processes*, 11, 31-38.

Landolfa, M.A. & Jacobs, G.A. 1995. Direction sensitivity of the filiform hair population of the cricket cercal system. *Journal of Comparative Physiology A*, 177, 759-766.

Laughlin, S.B. 1989. The role of sensory adaptation in the retina. *Journal of Experimental Biology*, 146, 39-62.

Levin, J.E. & Miller, J.P. 1996. Broadband neural encoding in the cricket cercal sensory system enhance by stochastic resonance. *Nature*, 380, 165-168.

Levine, R.B. & Murphey, R.K. 1980. Pre- and postsynaptic inhibition of indentified giant interneurons in the cricket (*Acheta domesticus*). *Journal of Comparative Physiology A*, 135, 269-282.

Libersat, F., Leung, V., Mizrahi, A., Mathenia, N. & Comer, C. 2005. Maturation of escape circuit function during the early adulthood of cockroaches *Periplaneta Americana*. *Journal of Neurobiology*, 62, 62-71.

Magal, C., Dangles, O., Caparroy, P. & Casas, J. 2006. Hair canopy of cricket sensory system tuned to predator signals. *Journal of Theoretical Biology*, 241, 459-466.

Mason, W.T. 1993. Fluorescent and luminescent probes for biological activity: A practical guide to technology for quantitative real-time analysis. Academic press limited.

Matzumoto, S.G. & Murphey, R.K. 1977. The circus-to-giant interneuron system of crickets. IV. Patterns of connectivity between receptors and the medial giant interneuron. *Journal of Comparative Physiology A*, 119, 319-330.

Mendenhall, B. & Murphey, R.K. 1974. The morphology of cricket giant interneurons. *Journal of Neurobiology*, 5, 565-580.

Miller, J.P. & Jacobs, G.A. 1984. Relationships between neuronal structure and function. *Journal of Experimental Biology*, 112, 129-145.

Miller, J.P., Jacobs, G.A. & Theunissen, F.E. 1991. Representation of sensory information in the cricket cercal sensory system. I. Response properties of the primary interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 66, 1680-1689.

Murphey, R.K., Palka, J. & Hustert, R. 1977. The circus-to-giant interneuron system of crickets. II. Response characteristics of two giant interneurons. *Journal of Comparative Physiology A*, 119, 285-300.

Murphey, R.K. 1981. The structure and development of a somatotopic map in crickets: the cercal afferent projection. *Developmental Biology*, 88, 236-246.

Nentwig, W. 1987. *Ecophysiology of spiders*. Berlin: Springer-Verlag.

Ogawa, H., Baba, Y. & Oka, K. 1996. Dendritic Ca^{2+} response in cercal sensory interneurons of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Neuroscience Letters*, 219, 21-24.

Ogawa, H., Baba, Y. & Oka, K. 1999. Dendritic Ca^{2+} transient increase evoked by wind stimulus in the cricket giant interneuron. *Neuroscience Letters*, 275, 61-64.

Ogawa, H., Baba, Y. & Oka, K. 2001. Dendritic calcium accumulation regulates wind sensitivity via short-term depression at cercal sensory-to-giant interneuron synapses in the cricket. *Journal of Neurobiology*, 46, 301-313.

Ogawa, H., Baba, Y. & Oka, K. 2002. Spike-triggered dendritic calcium transients depend on synaptic activity in the cricket giant interneurons. *Journal of Neurobiology*, 50, 234-244.

Ogawa, H., Baba, Y. & Oka, K. 2004. Directional sensitivity of dendritic calcium responses to wind stimuli in the cricket giant interneuron. *Neuroscience Letters*, 358, 185-188.

Ogawa, H., Cummins, G.I., Jacobs, G.A. & Miller, J.P. 2005. Visualization of ensemble activity patterns of mechanosensory afferents in the cricket cercal sensory system with calcium imaging. *Journal of Neurobiology*, 66, 293-307.

Palka, J. & Olberg, R. 1977. The cercus-to-giant interneuron system of crickets. III. Receptive field organization. *Journal of Comparative Physiology A*, 119, 301-31.

Palka, J., Levine, R. & Schubiger, M. 1977a. The cercus-to-giant interneuron system of crickets. I. Some attributes of the sensory cells. *Journal of Comparative Physiology A*, 119, 267-283.

Paydar, S., Doan, C.A. & Jacobs, G.A. 1999. Neural mapping of direction and frequency in the cricket cercal sensory system. *Journal of Neuroscience*, 19, 1771-1781.

Plummer, M.R. & Camhi, J.M. 1981. Discrimination of sensory signals from noise in the escape system of the cockroach : the role of wind acceleration. *Journal of Comparative Physiology A*, 142, 347-357.

Rinberg, D. & Davidowitz, H. 2000. Do cockroaches 'know' about fluid dynamics? *Nature*, 405, 756.

Ritzmann, R. 1984. The cockroach escape response. In: *Neural mechanisms of startle behaviour*. (Ed. by Robert, C.E.), New York: Plenum Press, pp. 93-131.

Ritzmann, R.E. 1993. The neural organization of cockroach escape and its role in context-dependent orientation. In: *Biological neural networks in invertebrate neuroethology and robotics*. (Ed. by Beer, R.E., Ritzmann, R.E. & McKenna, T.), New York: Academic Press, pp 113-137.

Roddey, C & Jacobs, G. 1996. Information theoretic analysis of dynamical encoding by filiform mechanoreceptors of the cricket cercal system. *Journal of Neurophysiology*, 75, 1365-1376.

Ronacher, B. & Hennig, R.M. 2004. Neuronal adaptation improves the recognition of temporal patterns in a grasshopper. *Journal of Comparative Physiology A*, 190, 311-319.

Sachse, S. & Galizia, C.G. 2003. The coding of odour-intensity in the honeybee antennal lobe: local computation optimizes odour representation. *European Journal of Neuroscience*, 18, 2119-32.

Sandoz, J.C., Galizia, C.G. & Menzel, R. 2003. Side-specific olfactory conditioning leads to more specific odor representation between sides but not within sides in the honeybee antennal lobes. *Neuroscience*, 120, 1137-48.

Schrader, Š. 2000. The function of the cercal sensory system in escape behaviour of the cave cricket *Troglophilus neglectus* Krauss. *Pflugers Archi v- European Journal of Physiology*, 439, R187-R189.

Shimozawa, T. & Kanou, M. 1984. Varieties of filiform hairs : range frationation by sensory afferents and cercal interneurons of a cricket. *Journal of Comparative Physiology A*, 155, 485-493.

Shimozawa, T., Murakami, J. & Kumagai, T. 2003. Cricket wind receptors: thermal noise for the highest sensitivity known. In: *Sensors and sensing in biology and engineering* (Ed. By Barth, F.G., Humphrey, J.A.C.& Secomb, T.W). Berlin: Springer Verlag, pp. 145-157.

Steinmann, T., Casas, J., Krijnen, G. & Dangles, O. 2006. Air-flow sensitive hairs: boundary layers in oscillatory flows around arthropod appendages. *Journal of Experimental Biology*, 209, 4398-4408.

Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K. & Konnerth, A. 2003. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7319-24.

Tabor, R., Yaksi, E., Weislogel, J.M. & Friedrich, R.W. 2004. Processing of odor mixtures in the zebrafish olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 24, 6611-20.

Tauber, E. & Camhi, J.M. 1995. The wind-evoked escape behavior of the cricket *Gryllus bimaculatus* : integration of behavioral elements. *Journal of Experimental Biology*, 198, 1895-1907.

Tobias, M. & Murphey, R.K. 1979. The response of cercal receptors and identified interneurons in the cricket (*Acheta domesticus*) to airstreams. *Journal of Comparative Physiology A*, 129, 51-59.

Torre, V., Ashmore, J.F., Lamb, T.D. & Menini, A. 1995. Transduction and adaptation in sensory receptor cells. *Journal of Neuroscience*, 15, 7757-7768.

Touratier, G. 1951. A propos du mode de nutrition du *Nemobius sylvestris* (Bosc). *Bulletin de la société zoologique de France*, 76, 29-34.

Wang, J.W., Wong, A.M., Flores, J., Vosshall, L.B. & Axel, R. 2003. Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell*, 112, 271-82.

Whener, R. 1987. 'Matched filters' – neural models of the external world. *Journal of Comparative Physiology A*, 161, 511-531.

Yono, O. & Shimozawa, T. 2008. Synchronous firing by specific pairs of cercal giant interneurons in crickets encodes wind direction. *ByoSystems*, 93, 218-225.

Zar, J. H. 2009. *Biostatisitcal Analysis*, 5rd. edn. New Jersey: Prentice Hall, Engelwood Cliffs, pp. 624-628.

ANNEXES

Annexe 1 Caractéristiques du piston

Le piston (LAL35, Cedrat technologies, Meylan, France) utilisé pour mimer l'attaque d'araignées est constitué d'un cylindre (0.8 cm de diameter) dont le déplacement est généré par un actionneur et plus précisément par un champ magnétique produit au sein d'une bobine de l'actionneur. L'actionneur est connecté à un contrôleur, ce dernier est alimenté par un générateur et connecté à un ordinateur (Fig. 36).

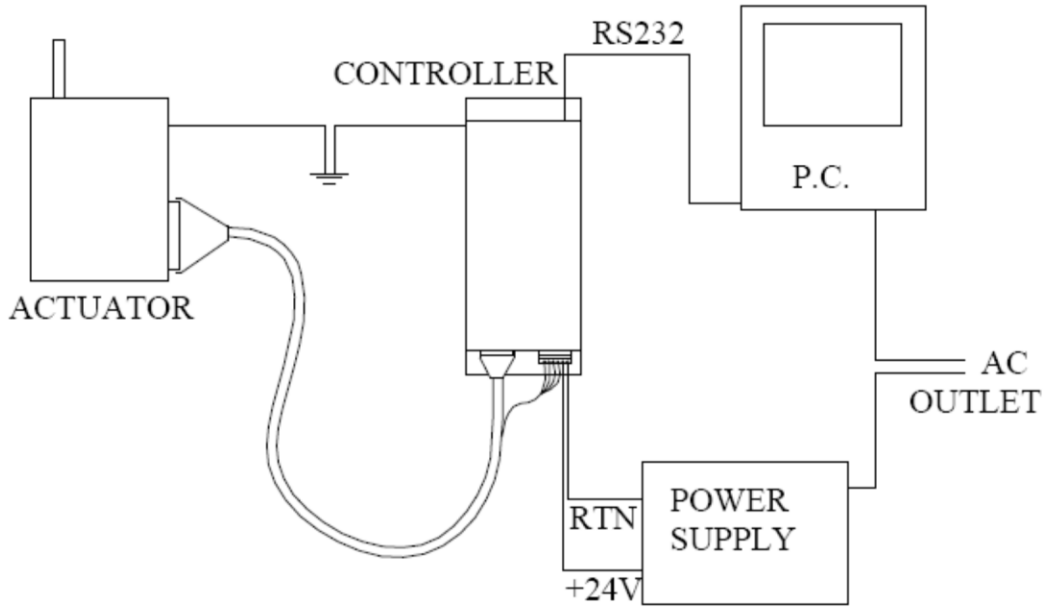

Figure 38 : Schéma général de connexion du piston. (From SMAC moving coil actuator website)

Le déplacement du piston a été filmé grâce à une caméra haute vitesse CMos RDT/16 (DR'S DATA & IMAGING SYSTEMS, Oakland, NJ 07436, USA) à une fréquence de 800 images par seconde, une résolution de 1024 x 624 pixels et une lentille f2.8/28-75 mm. Les vidéos ont été acquises grâce au logiciel MIDAS 2 (Xcitex Inc., Cambridge, MA 02141, USA) et analysées avec le logiciel Midas player 2.1.8.1 (Xcitex Inc., Cambridge, MA 02141, USA).

L'analyse des données nous a permis de mesurer la vitesse, l'accélération et la position du piston pour les 6 vitesses utilisées dans ce travail 5, 11, 15, 25, 40, 50 cm/s.

L'accélération du piston est la même pour les 6 vitesses de déplacement utilisées. Elle est d'environ 1200 cm/s^2.

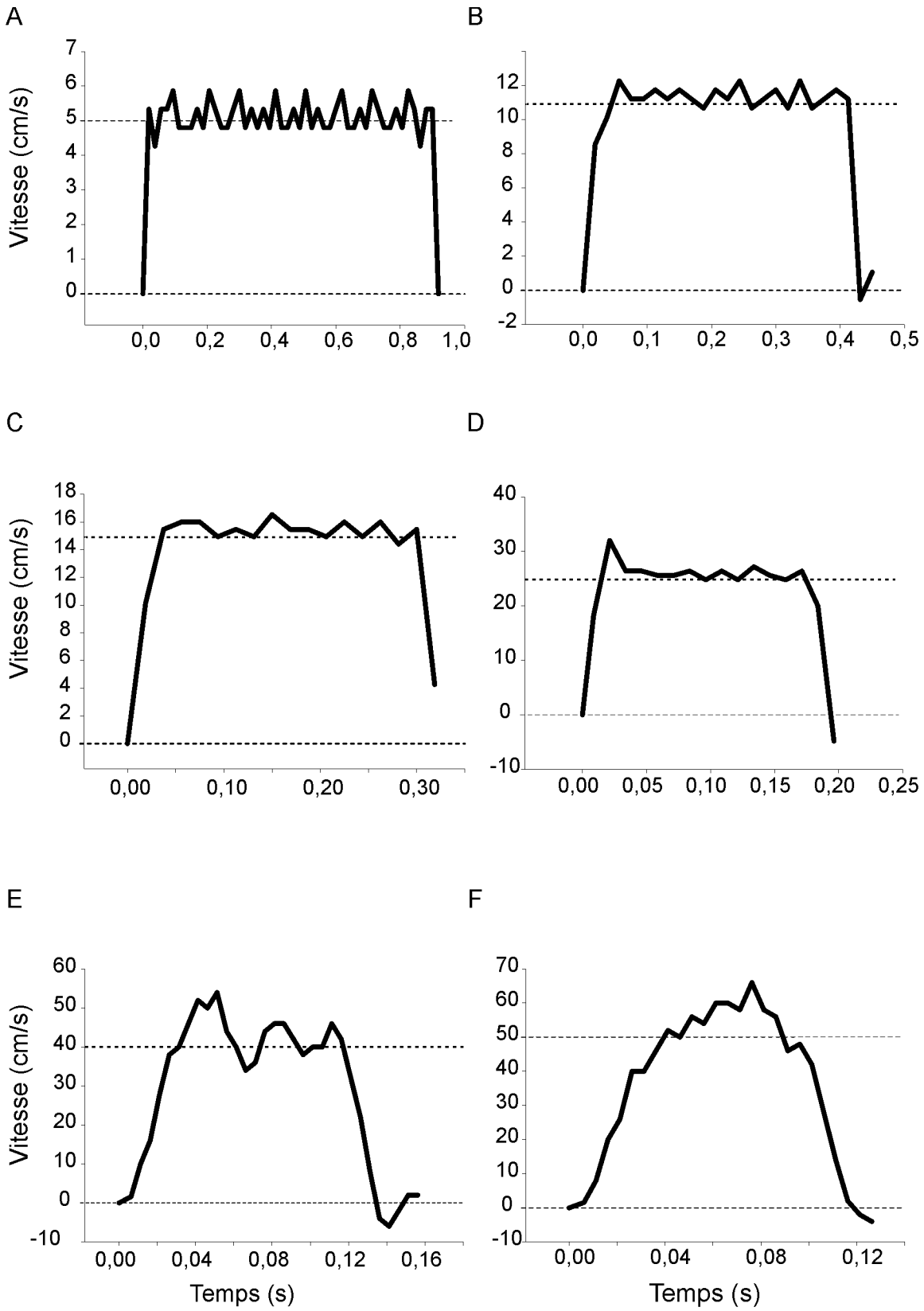

Figure 39 : Vitesse du piston en fonction du temps pour (A) 5 cm/s. (B) 11 cm/s. (C) 15 cm/s. (D) 25 cm/s. (E) 40 cm/s. (D) 50 cm/s. La ligne rouge indique la vitesse considérée.

La distance entre le piston et la pointe des cerques d'un grillon a été calculée et représentée au cours du temps dans la figure 40 pour les 6 vitesses pour une distance de départ de 5,2 cm.

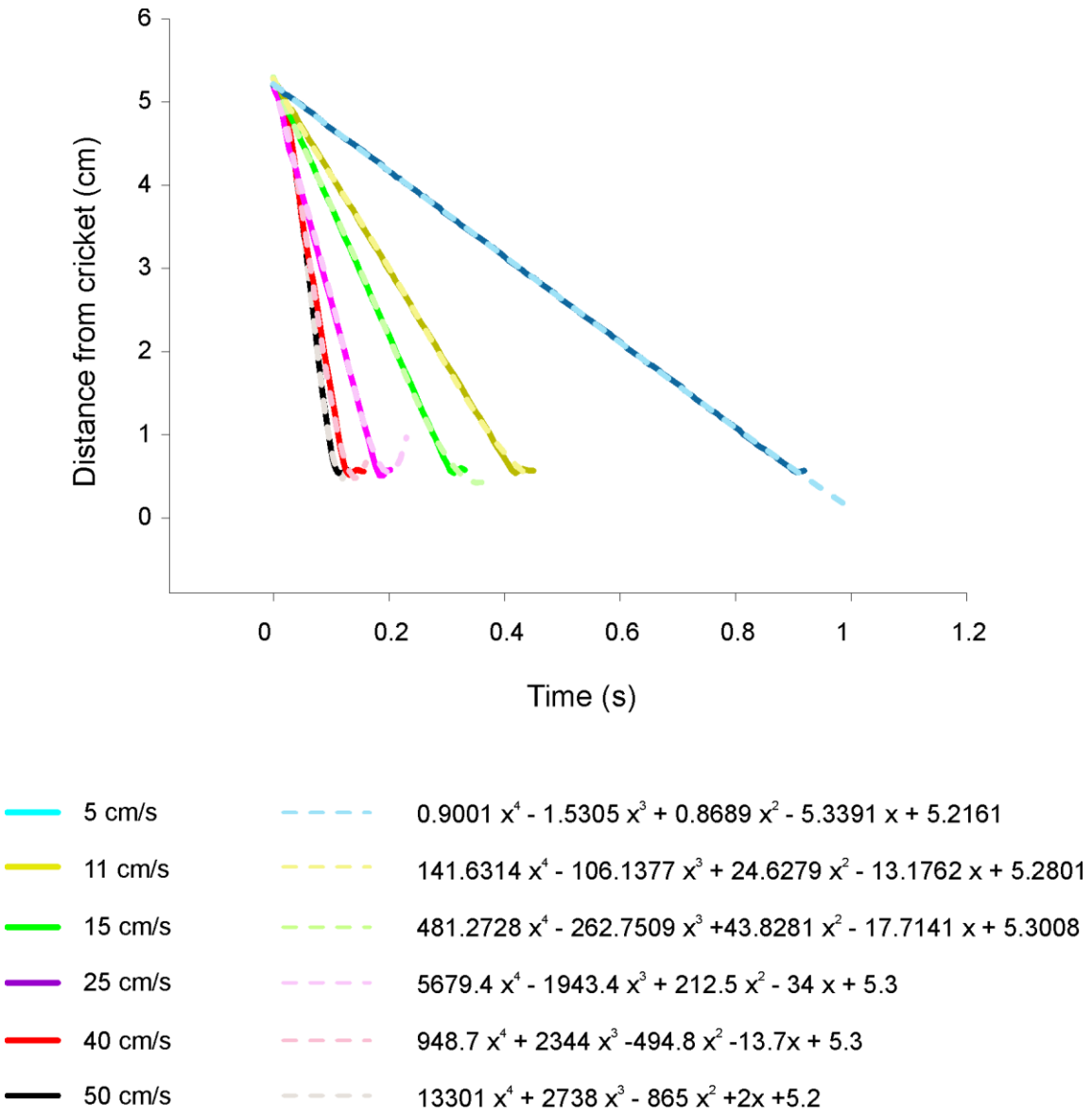

Figure 40 : Distance entre le piston et la pointe du cerque d'un grillon en fonction du temps pour 6 vitesses 5 cm/s (en bleu), 11 cm/s (en jaune), 15 cm/s (en vert), 25 cm/s (en violet), 40 cm/s (en rouge) et 50 cm/s (en noir). Les tracés en pointillés représentent le tracé de la fonction qui a été ajustée aux données expérimentales représentés en trait plein. Les mêmes couleurs en pastel ont été utilisées pour représenter les résultats de chaque vitesse.

Des fonctions ont été ajustées aux données mesurées. Ceci nous a permis de calculer la distance du piston à la pointe du cerque au moment correspondant à la latence de réponse des

neurones. Les fonctions obtenues sont représentées en pointillé de couleur pastel correspondant à la couleur des données mesurées.

Exemple de routine de contrôle du piston :

```
md0,mf
MD1,AL254,LV26,LV27,EV26,EV27
MD2,FR1,SG100,SI250,SD1200,IL5000,SC2000,RI1,FR1,MJ7
MD7,VM,MN,SQ15000,SV30000,SA10000,SE2000
MD8,MJ22
MD9,RW538,IB-500,FI,MJ25,MJ9
MD10,RL448,IC10,ST,MJ11,RW538,IG500,NO,MJ34,MJ10
MD11,WS25,MG"encoder index found",PM,SE10000,SQ10000,GH,WS400,MJ34
MD22,DI1,GO,RL448,IS1,MF,MJ32,WA100,MJ9
MD25,DI0,GO,RL448,IS1,MF,MJ32,WA100,MJ10
MD30,mg"lin encoder inoperative - check"
MD32,mg"Servo fault - test cables ans mechanics"
MD34,mg"no index",mf,mc35,ep
md35,mg"************************"
md36,mg"pour 5cm/s (sv=131072)....taper ms50";
md37,mg"pour 11cm/s (sv=288358)....taper ms60";
md38,mg"pour 15cm/s (sv=393216)....taper ms70";
md39,mg"pour 25cm/s (sv=655360)....taper ms80";
md40,mg"pour 30cm/s (sv=786432)....taper ms90";
md41,mg"pour 40cm/s (sv=1048576)....taper ms100";
md42,mg"pour 50cm/s (sv=1310720)....taper ms110";
md43,mg"************************",rc
md44,;
md45,;
md46,;     Les no de lignes doivent se suivre de 1 en 1
md47,;    canal 0=pin 9, ch0=activation high(5v), cn0=activ, cf0=desactivation
md49,;
md50,sv131072,mn
md51,ma9000,ch0,cn0,go,ws1,cf0,wa5000,ch0,cn0,ma0,go,ws1,cf0,mc35,ep
md59,;
md60,sv288358,mn
md61,ma9000,ch0,cn0,go,ws1,cf0,wa5000,ch0,cn0,ma0,go,ws1,cf0,mc35,ep
md69,;
md70,sv393216,mn
md71,ma9000,ch0,cn0,go,ws1,cf0,wa5000,ch0,cn0,ma0,go,ws1,cf0,mc35,ep
md79,;
md80,sv655360,mn
md81,ma9000,ch0,cn0,go,ws1,cf0,wa5000,ch0,cn0,ma0,go,ws1,cf0,mc35,ep
md89,;
md90,sv786432,mn
md91,ma9000,ch0,cn0,go,ws1,cf0,wa5000,ch0,cn0,ma0,go,ws1,cf0,mc35,ep
md99,;
md100,sv1048576,mn
```

md101,ma9000,ch0,cn0,go,ws1,cf0,wa5000,ch0,cn0,ma0,go,ws1,cf0,mc35,ep
md109,;
md110,sv1310720,mn
md111,ma9000,ch0,cn0,go,ws1,cf0,wa5000,ch0,cn0,ma0,go,ws1,cf0,mc35,ep

Fabienne DUPUY

La perception des mouvements d'air par le système cercal chez le grillon des bois *Nemobius sylvestris*

Résumé

Les orthoptères possèdent des cerques pourvus de poils filiformes qui leurs permettent de percevoir des courants d'air. Nous nous sommes attachés à mieux comprendre comment le système cercal permet aux insectes de détecter l'attaque des prédateurs dans leur milieu naturel. Nous avons étudié le grillon des bois. Afin de stimuler le grillon de manière appropriée, c'est-à-dire en mimant l'attaque d'un prédateur naturel, nous avons utilisé un piston. Les capacités de détection et de fuite de ce grillon ainsi que le rôle des cerques dans cette détection par rapport à d'autres organes ont été analysés. Des enregistrements extracellulaires ont été réalisés sur des grillons libres en milieu naturel. Un mécanisme de modulation de l'activité nerveuse en réponse à l'attaque, en présence de bruit de fond a été observé. Un logiciel permettant d'analyser des données optophysiologiques a été développé.

Mots clés : *Nemobius sylvestris*, cerques, neurobiologie, comportement

Abstract

Orthoptera insects own cerci covered by filiform hairs which allow perceiving air movements. Our goal was to better understand how the cercal sensory system allows insects to detect predator attacks in their natural environment. We studied the wood cricket, which natural habitat, i.e. the forest litter, is easily accessible for field studies. To stimulate appropriately the cricket e.g. mimicking a natural predator attack, we used a piston. We analysed the detection and escape capabilities of this cricket and the relative role of cerci in this detection, compared to other organs by means of behavioural studies. Extracellular recordings were conducted on free-moving crickets in their natural habitat. A modulation of neural activity in response to attacks was observed in presence of background noise. A software allowing optophysiological data analysis was developed.

Key words : *Nemobius sylvestris*, cerci, neurobiology, behaviour