



HAL
open science

Analyse haut-débit du comportement spontané d'un organisme modèle “ simple ”

Olivier Mirat

► **To cite this version:**

Olivier Mirat. Analyse haut-débit du comportement spontané d'un organisme modèle “ simple ”. Sciences agricoles. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT: 2013PA05T023 . tel-00881755

HAL Id: tel-00881755

<https://theses.hal.science/tel-00881755>

Submitted on 8 Nov 2013

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 Paris Descartes Paris 5
Ecole Doctorale Frontières du Vivant

Thèse de Doctorat

Spécialité
Interdisciplinaire Informatiques et Neurosciences

Olivier Mirat

Analyse haut-débit du comportement spontané d'un organisme modèle « simple »

Composition du Jury:

Président: Prof. Lionel Moisan

Rapporteur: Dr. Filippo Del Bene

Rapporteur: Dr. William Norton

Examineur: Dr. Stanley Durrleman

Directrice de thèse: Dr. Claire Wyart

*Laboratoire "Probing dynamic sensory-motor integration in spinal circuits"
Centre de Recherche Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (CRICM)
Inserm U975, UPMC Paris VI CNRS UMR 7225, Fondation ICM
CHU Pitié Salpêtrière, 83, bld de l'hôpital, 75013 Paris*

Table des matières

Résumé.....	4
Remerciements.....	6
Introduction.....	7
I-Le modèle de la larve de poisson zèbre et son comportement.....	9
A-Organismes modèles en neurosciences.....	9
1-Des expériences chez l'aplysie qui révélèrent des mécanismes fondamentaux de la plasticité synaptique à la base de la mémoire.....	9
2-Le besoin d'établir des mécanismes chez l'animal avant de tester chez l'homme.....	10
3-La larve de poisson-zèbre, un modèle émergent.....	10
B-Expériences comportementales sur la larve de poisson zèbre.....	12
1-Expériences de comportement spontané.....	12
2-Cribles chimiques et génétiques.....	13
3-Réponse comportementale à un stimulus.....	13
4-Optogénétique.....	14
5-Apprentissage.....	15
C-L'analyse du comportement spontané de plusieurs larves sur plusieurs minutes pour répondre à des besoins en terme d'analyse du comportement.....	16
1-Méthode de phénotypage de mouvement.....	16
2-Connaissance plus approfondie de la gamme de manœuvres décrites chez la larve de poisson zèbre.....	17
3-Une méthode générale d'analyse d'expériences comportementales sur un groupe d' animaux.....	20
II- Les moyens d'observation du comportement animal.....	23
A-L'analyse manuelle du comportement.....	23
1-Les bases de l'éthologie.....	23
2-L'observation subjective du comportement : une approche possible pour des cas simples.....	25
3-Les limites d'une quantification manuelle et subjective.....	25
B-L'apport de l'informatique et l'intelligence artificielle aux neurosciences comportementales.....	27
1-L'apport des caméras rapides et de l'acquisition directe sur disque.....	27
2-La vision par ordinateur et le suivi automatique de mouvements.....	28
3-Statistique globale sur les paramètres du mouvement.....	29
4-Algorithmes de Machine Learning et reconnaissance de comportements.....	32
C-Paradigme expérimental pour l'analyse à haut débit des mouvements spontanés chez la larve de poisson zèbre.....	34
1-Un paradigme d'analyse de mouvements spontanés à haut débit.....	34
2- Etat de l'art des systèmes d'analyse à haut-débit de comportement spontané.....	37
3-Limites des systèmes existants et création de ZebraZoom.....	40
III-Les bases de ZebraZoom : dispositif expérimental, suivi et détection de mouvements.....	42
A-Dispositif expérimental.....	42
1-Poissons zèbre.....	42
2-Enregistrements du comportement.....	42
B-Algorithmes de Tracking.....	45
1-Tracking de la tête des poissons zèbre.....	45
2-Tracking de la queue des larves de poisson zèbre.....	51
3- Gestion des contacts entre larves lors de l'algorithme de tracking.....	53
C-Détection de mouvements.....	56
1-Algorithmes de détection de mouvements.....	56
2-Validation de la détection de mouvements lors du tracking.....	57
IV-ZebraZoom : Quantification globale du comportement.....	59

A-Quantification du comportement par des paramètres globaux.....	59
1-Extraction de paramètres globaux.....	59
2-Analyses par paramètres globaux.....	60
B-Exemple de quantification du comportement avec des paramètres globaux.....	62
1-Réseaux neuronaux impliqués dans la locomotion.....	62
2-Le rôle de la glycine dans la locomotion.....	63
3-Le rôle de la vision dans la locomotion.....	68
V-ZebraZoom : Catégorisation automatique des manœuvres effectuées par les larves de poisson zèbre.....	72
A-Méthode de catégorisation automatique des manœuvres.....	72
1-Le répertoire de manœuvres de la larve de poisson zèbre.....	72
2-Continuum entre comportements.....	75
3-Paramètres dynamiques pour la catégorisation automatique des manœuvres	79
4-Algorithmes de Catégorisation Automatique.....	82
5-Validations de la catégorisation de ZebraZoom.....	83
B- Application de la catégorisation de manœuvres par ZebraZoom.....	88
1-Estimation de la récurrence des manoeuvres.....	88
2-Etudes de la succession des mouvements.....	90
VI-Conclusion.....	93
A-ZebraZoom, une avancée pour l'analyse du comportement moteur pour la larve de poisson zèbre.....	93
B-Le futur de l'analyse du comportement des poissons zèbre.....	96
1-Optimiser le tracking au niveau précision et rapidité.....	96
2- D'autres descripteurs du comportement.....	97
3-De meilleurs paramètres dynamiques pour représenter la complexité du mouvement.....	98
4-Prise en compte du continuum comportemental dans les algorithmes de catégorisation.....	99
C- Perspectives.....	100
Abréviations.....	102
Annexe 1: Figures Supplémentaires.....	103
Annexe 2: Article publié dans Frontiers in Neural Circuits.....	105
Bibliographie.....	118

Résumé

L'utilisation d'organismes génétiques modèles a permis l'investigation à grande échelle de mécanismes cellulaires et moléculaires pour la biologie. La larve de poisson zèbre (*Danio rerio*) est un organisme vertébré modèle simple qui présente plusieurs avantages pour identifier les bases moléculaires et pharmacologiques du développement et du comportement à travers des cribles génétiques et chimiques respectivement. Plusieurs paradigmes expérimentaux reposent sur une caractérisation précise du phénotype comportemental associé avec un génotype ou l'application d'une drogue. Ce processus de phénotypage bénéficierait d'une compréhension globale des manoeuvres possibles afin de caractériser précisément le comportement globale de larves observé au cours d'une expérience. L'analyse sur plusieurs minutes de la locomotion spontanée des larves de poisson zèbre en groupe fournit un cadre idéal pour atteindre ces objectifs.

Si l'analyse manuelle du comportement animal est possible pour l'observation de manoeuvres isolées et stéréotypées, elle n'est pas compatible avec une approche à grande échelle. A partir de cinq jours, la larve de poisson zèbre se meut sous forme de bouffées natatoires qui arrivent à haute fréquence et sont séparées par quelques secondes. La difficulté d'observation à haute fréquence et d'analyse de la locomotion en bouffée rend une analyse manuelle simple à partir de séquences vidéos du comportement impossible. Le développement récent de caméras rapides avec acquisition en mode continu, couplé aux avancées en informatique et en intelligence artificielle rend possible une analyse automatique du comportement. Les systèmes commerciaux actuels permettent des enregistrements sur des longues durées mais sans capturer la complexité et la diversité des mouvements réalisés. Nous avons donc créé ZebraZoom, notre système d'analyse haut débit permettant de suivre, de quantifier et de catégoriser le comportement spontané de chaque larve de poisson zèbre au sein d'un groupe.

Nous avons monté un dispositif expérimental qui consiste à placer sept larves de poisson zèbre âgées d'entre cinq et sept jours dans huit boîtes de pétri. Les boîtes de pétri sont disposées sur une table lumineuse et une caméra rapide positionnée au-dessus enregistre le comportement spontané à 337 Hz pendant quatre minutes. Une fois la vidéo acquise, ZebraZoom localise automatiquement chacune des huit boîtes de pétri, puis suit tête et queue de chacun des animaux sur l'ensemble de la vidéo, grâce à des procédures de vision par ordinateur. ZebraZoom identifie automatiquement chaque bouffée natatoire.

Le phénotypage du comportement a été réalisé grâce à deux méthodes complémentaires : l'extraction de paramètres globaux caractérisant la dynamique des mouvements et la catégorisation automatique des mouvements en différents manoeuvres stéréotypées. Nous avons utilisé l'analyse des paramètres globaux afin de caractériser l'effet de drogues agissant sur les récepteurs de neurotransmetteurs et l'analyse d'un mutant aveugle. La catégorisation automatique des mouvements est réalisée grâce à des procédures d'apprentissage automatique (« Machine Learning »). Nous avons illustré l'utilité de cette catégorisation pour étudier les interactions entre larves

à ces stades précoces. En conclusion, notre programme ZebraZoom permet de réaliser un phénotypage automatique et complet, et cette approche pourra être appliquée dans d'autres systèmes et contextes expérimentaux.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier ma directrice de thèse, Claire Wyart, pour m'avoir accepté dans son laboratoire à l'ICM, pour m'avoir guidé tout au long de mon travail, et pour avoir relu ce manuscrit. Je remercie également l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Européenne Frontières du Vivant ED474 Program Doctoral Bettencourt pour leur formation interdisciplinaire très enrichissante; et tout particulièrement Samuel Bottani, directeur des études de la FdV, pour sa disponibilité. Je tiens également à remercier DIGITEO qui a apporté le soutien financier indispensable à la réalisation de ce projet.

J'aimerais également remercier l'ensemble des membres du jury : Claire Wyart, directrice de thèse ; Lionel Moisan, président du jury ; Filippo Del Bene, rapporteur ; William Norton, rapporteur ; Stanley Durrleman, examinateur.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé au projet autour de ZebraZoom : Claire Wyart, pour avoir supervisé ce travail et pour avoir réalisé des classifications automatique ; Jenna Sternberg, pour avoir fait de nombreuses expériences comportementales ainsi que des classifications manuelles du comportement ; Victor Adenis et Maxime Gaudin pour avoir également réalisé de nombreuses expériences comportementales ; Kristen Severi pour avoir réalisé des classifications manuelles ; Devika Nair pour avoir réalisé les premières expériences comportementales et classifications ; Stanley Durrleman, Olivier Colliot, Lionel Moisan, Ryad Benosman, et Sio-Hoï Ieng pour leur aide précieuse en ce qui concerne les questions de tracking, de Machine Learning, et plus généralement d'analyse du comportement ; la société R&D Vision, et tout particulièrement Sebastien Bouilhol, Arnaud Susset, Jimmy Davidson, et Olivier Lambert pour leur aide concernant les caméras rapides ; Caroline Vidal et Philippe Domineaux de la DSI de l'ICM pour l'accès au serveur de données qui nous a été extrêmement utile ; ainsi que Audrey Baradel, Laura Garnero et Joël François pour leur aide concernant les poissons zèbre. J'aimerais également remercier Rodolphe Martin et Henri Jouhaud pour les nombreuses aides et idées personnelles qu'ils m'ont apportées et qui m'ont été très utiles. Merci enfin à tous ceux que j'aurais pu oublier et qui m'ont apporté leur aide au cours de mon travail.

Introduction

Au XIXe siècle, les microscopes n'étaient pas assez résolutifs pour observer les neurones, cellules élémentaires constituant le système nerveux. À la fin des années 1880, Camillo Golgi a mis au point une nouvelle technique de coloration cellulaire, la coloration argentique, qui en ne colorant qu'une seule cellule parmi environ une centaine lui permit d'observer sa morphologie (Golgi 1901). Ramón y Cajal utilisa cette méthode pour caractériser pour la première fois des neurones isolés: leur corps cellulaires, leur axones et leurs dendrites de neurones (y Cajal 2002). Sans les avancées techniques de Camillo Golgi, cette découverte n'aurait pas été possible. Comme illustré dans cet exemple, c'est le développement de technologies et de méthodes adaptées au sujet d'étude qui rend possible l'avancée des connaissances en neurosciences.

Une des nombreuses stratégies utilisées aujourd'hui en neuroscience consiste en l'utilisation d'organismes modèles simples et facilement manipulables génétiquement pour l'investigation de questions biologiques (Brenner 1974; Adams 2000; Chinwalla et al. 2002). Le poisson zèbre *Danio rerio* est ainsi exploité depuis les années 1980 car le développement de ce petit vertébré est robuste et rapide, la transgénèse est facile, aux stades embryonniques et larvaires l'animal est transparent et tient facilement dans des boîtes multi-puis (Fetcho and Liu 1998). Plusieurs cribles génétiques et chimiques ont permis d'identifier les gènes et voies pharmacologiques modulant le développement et le comportement (Granato et al. 1996; Driever et al. 1996). Ces expériences comportementales sur les embryons et larves de poisson zèbre nécessitent de quantifier sur de grandes populations l'effet d'une mutation ou d'un composé chimique spécifique. Cette tâche est complexe car le mouvement de ces larves est difficile à observer et à analyser. En effet, des études préliminaires à partir de caméras rapides ont mis en évidence qu'après cinq jours post fertilisation (« dpf »), la larve d'environ 4mm de long nage très rapidement (battements de queue pouvant dépasser 100Hz (Muller 2004)) sur des périodes de temps très courtes (environ quelques centaines de millisecondes) répétées toutes les quelques secondes (Lambert, Bonkowsky,

and Masino 2012). Dès le stade larvaire, l'animal est capable de réaliser différents types de manœuvres locomotrices qui ont été décrits à partir de suivi manuel image par image sur un nombre restreint de mouvements (Budick and O'Malley 2000). Puisque c'est souvent le développement de technologies et de méthodes adaptées au sujet d'étude qui rend possible l'avancée des connaissances en neuroscience, et que le comportement de la larve de poisson zèbre est quelque chose de complexe aussi bien à observer qu'à analyser, on est en droit de se demander si les méthodes actuelles dédiées à l'analyse du comportement moteur de la larve de poisson zèbre sont suffisamment adaptées, et le cas échéant, comment les améliorer?

Pour répondre à cette question, nous présenterons dans le premier chapitre en quoi les organismes modèles sont utilisés en neurosciences et les avantages de la larve de poisson zèbre. Nous verrons les expériences comportementales typiques réalisées dans ce modèle et nous verrons en quoi l'analyse du comportement spontané de plusieurs larves sur plusieurs minutes permet de répondre à des besoins en terme d'analyse du comportement. Dans le deuxième chapitre, nous montrerons les techniques d'analyse du comportement utilisées jusqu'à présent ainsi que les caractéristiques minimales requises pour la mise en place d'un système d'analyse haut-débit du comportement spontané. Dans les trois chapitres suivants, nous présenterons notre programme ZebraZoom que nous avons mis en place pour automatiquement suivre les animaux individuellement dans un groupe, quantifier les paramètres caractérisant le comportement moteur de la larve de poisson zèbre et catégoriser les différentes manœuvres. Nous présenterons la validation de notre programme comparé aux estimations subjectives et nous illustrerons des résultats d'expériences prouvant l'utilité de ce nouveau système. Dans le dernier chapitre nous montrerons les limites et perspectives qui permettraient d'améliorer notre programme.

I-Le modèle de la larve de poisson zèbre et son comportement

A-Organismes modèles en neurosciences

L'utilisation d'organismes modèles est essentielle en biologie et la larve de poisson zèbre est un modèle émergent depuis les années 1980 qui présente de nombreux avantages.

1-Des expériences chez l'aplysie qui révélèrent des mécanismes

fondamentaux de la plasticité synaptique à la base de la mémoire

En 1958, Drs. Eric R. Kandel et Alden Spencer rejoignirent le NIH avec pour objectif de comprendre les mécanismes de la mémoire et de l'apprentissage chez les mammifères au niveau de l'hippocampe, centre de la mémoire chez l'homme (Kandel 2001). Ils cherchaient à comprendre comment l'information sensorielle associée à une expérience était processed dans l'hippocampe afin de retenir une trace de mémoire. Cette étude chez les mammifères était difficile vu le grand nombre de neurones et de synapses. Dr Kandel eu l'intuition qu'il fallait étudier les procédés de la mémoire et de l'apprentissage dans un organisme plus simple où le nombres de neurones et leurs synapses étaient restreints. Dr Kandel rejoignit le laboratoire de Ladislav Taulc pour apprendre à disséquer et enregistrer les neurones des ganglions de l'*Aplysia californica* caractérisé par peu de neurones, facilement identifiable, et de très grandes tailles (jusqu'au millimètre). En étudiant la plasticité du réflexe de repli en cas d'agression extérieure, Dr Kandel mit en lumière pour la première fois les mécanismes cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire. Tel que suggéré par Hebb, il mit en évidence que le processus d'apprentissage était corrélé avec le renforcement de connexions synaptiques entre neurones. On voit donc dans cet exemple en quoi l'utilisation d'un animal modèle simple peut permettre la mise en évidence de processus neurologiques qui sous-tendent un comportement.

2-Le besoin d'établir des mécanismes chez l'animal avant de tester chez l'homme

Afin de réaliser des expérimentations plus invasive et sur des organismes moins "complexe" que l'homme, l'attention des biologistes s'est concentrée dès le début du vingtième siècle sur certaines espèces pour lesquels l'élevage était possible, le temps de reproduction court et la mutagenèse et transgénèse faciles. Ces espèces nommées organismes génétiques modèles incluent la drosophile *Drosophila melanogaster* (Morgan 1911; Adams 2000), la souris *Mus musculus* (Cuénot 1908; Chinwalla et al. 2002), le nématode *C. Elegans* (Brenner 1974) et récemment le poisson zèbre *Danio rerio*.

La recherche translationnelle vise de plus en plus à utiliser des cohortes de patients pour identifier des gènes clés dans des pathologies neurologiques. Mais le rôle de ces gènes ne peut être établi que dans des modèles animaux où des manipulations invasives sont possibles. Lorsque les gènes identifiés sont conservés chez vertébrés et invertébrés, leur étude chez la drosophile ou le nématode a l'avantage que les temps de génération de mutants et de transgéniques sont courts. Ces travaux permettent de soulever des hypothèses de travail sur les fonctions possibles des gènes identifiés. Néanmoins il est nécessaire de tester le rôle de ces gènes dans des espèces vertébrées plus proche des mammifères, et éventuellement en cultures de cellules humaines et chez le primate ou les patients humains sur des prélèvements de tissus.

3-La larve de poisson-zèbre, un modèle émergent

L'engouement pour cet animal vient initialement du fait qu'il se développe très rapidement et qu'il est transparent au stade embryonnaire et larvaire, ce qui facilite le suivi des cellules grâce à des méthodes optiques. Le poisson zèbre se caractérise par son nombre de neurones relativement restreint (tels le *C.Elegans* et la *Drosophila melanogaster*) (environ 200 000 neurones dans le système nerveux de la larve) et par le fait qu'il appartient à la classe des vertébrés.

Rapidement il a été évident que le poisson zèbre était facilement

manipulable d'un point de vue génétique, avec des cribles de mutagenèse initialement (Driever et al. 1996), puis des méthodes d'inactivation de gènes (Bill et al. 2009; Nasevicius and Ekker 2000), avec la transgénèse fondée sur la transposase *tol2* (Kawakami 2004), les nucléases de type *Talen* et *Crispr* (Huang et al. 2011; Zu et al. 2013; Hwang et al. 2013).

Très récemment le génome du poisson zèbre a été entièrement séquencé (Howe et al. 2013). La mutagenèse a permis de mettre en évidence de nombreux gènes impliqués dans le développement et la morphogénèse (Granato et al. 1996; Driever et al. 1996). La transgénèse a permis d'exprimer des protéines fluorescentes dans des neurones, afin de suivre leur migration, leur morphologie ou plus récemment leur activité avec des senseurs de calcium encodés génétiquement (Higashijima 2003; Del Bene et al. 2010; Naumann et al. 2010; Ahrens et al. 2012). Les outils optogénétiques, permettant d'activer ou de rendre silencieux des neurones en temps réel peuvent être utilisés de manière non invasive grâce à la transparence du poisson zèbre au stade précoce (avant une semaine de développement post fertilisation). Il est possible d'activer des neurones en profondeur dans l'animal grâce à un faisceau de lumière non invasif (Douglass et al. 2008; Wyart et al. 2009; Kimura et al. 2013).

Le cycle de reproduction du *Danio rerio* est rapide (3 mois) et un couple se reproduit en produisant une centaine de larves. De par sa petite taille aux stades précoces, des expériences haut débit sont possibles telles que des cribles chimiques ou génétiques.

B-Expériences comportementales sur la larve de poisson zèbre

Un des défis actuels des neurosciences est de réussir à relier l'activité des réseaux de neurones d'un animal à son comportement. Dans des organismes modèles génétiques, il est possible de modifier des réseaux de neurones génétiquement identifiés grâce à des drogues ou à des manipulations génétiques et d'en observer les effets sur le comportement. Bien que la recombinaison homologue ne soit pas établie dans ce modèle, des approches de mutagénèse, de transgénèse, de knock-down permettent de nombreuses manipulations génétiques. Les larves de poisson zèbre sont désormais utilisées pour l'étude pharmacologique de comportements complexes tels que l'anxiété (Lee et al. 2010; Blaser, Chadwick, and McGinnis 2010; Cachat et al. 2011; Vermoesen et al. 2011; Zakhary et al. 2011; Griffiths et al. 2012), le sommeil (Zhdanova et al. 2001; Appelbaum et al. 2009), l'addiction (Petzold et al. 2009; Khor et al. 2011), et bien d'autres troubles psychiques tel le retard mental, l'autisme, la schizophrénie, les troubles de l'attention et l'hyperactivité (Norton 2013).

Afin d'étudier les réseaux neuronaux sous-tendant le comportement, plusieurs types d'expériences comportementales « type » pouvant être combinées entre elles sont réalisées chez la larve de poisson zèbre. Celles-ci sont décrites ci-dessous.

1-Expériences de comportement spontané

Les expériences de comportement spontané consistent simplement en l'observation du comportement des larves se déplaçant spontanément, sans intervention extérieure. Vermoesen et collaborateurs ont ainsi testé l'effet comportementale de divers antidépresseurs en observant le temps passé à nager par des larves uniques soumis ou non aux diverses drogues (Vermoesen et al. 2011). Afin d'étudier le rôle de la prédisposition génétique dans la dépendance, Petzold et collaborateurs ont quant à eux testé l'effet de la nicotine sur diverses larves mutantes en observant les quantités de mouvements réalisés spontanément par des groupes de larves ayant des génotypes spécifiques (Petzold et al. 2009). Chez les poissons-zèbre adultes,

l'observation du comportement spontané a également permis l'observation des périodes de sommeil grâce à l'identification de période d'inactivité suffisamment longue (Yokogawa et al. 2007; Appelbaum et al. 2009).

2-Cribles chimiques et génétiques

Grâce à la petite taille et au faible coût des larves, des expériences à grande échelle sont possibles. Des cribles génétiques ont été utilisés initialement chez les larves de poisson zèbre afin d'identifier les gènes impliqués dans la locomotion (Granato et al. 1996), ou bien dans la vision (Muto et al. 2005). La perméabilité de la larve à des composés chimiques est importante et facilite le crible de bibliothèques de drogues. Pour ces cribles, l'objectif est d'identifier des molécules ou des gènes ayant des actions visibles sur le comportement moteur. Les résultats d'une molécule peuvent permettre d'identifier une voie de modulation du comportement et de soulever des cibles chimiques potentielles pour des traitements. Rihel et collaborateurs dans une étude sur le sommeil ont par exemple montré qu'à l'issue d'un crible chimique il était possible de regrouper des réponses aux drogues sous forme de clusters à partir des données comportementales (J. Rihel et al. 2010).

3-Réponse comportementale à un stimulus

Plutôt que d'examiner le comportement spontané uniquement, de nombreuses études se concentrent sur les réponses comportementales à des stimulations sensorielles. Ces expériences permettent de cibler sur une modalité sensorielle précise et présentent l'avantage qu'une séquence temporelle courte soit enregistrée. Un des premiers cribles sur l'embryon de poisson zèbre a été initié par Michael Granato et coll. et consistait à tester la réponse de fuite suite à une stimulation mécanique (Granato et al. 1996). Depuis des stimulations optiques tels que des changements globaux de lumière ambiante (Burgess and Granato 2007) ou des bandes lumineuses blanches et noires qui miment une dérive du champ visuel (Opto-Motor Response, (Sajovic and Levinthal 1982; Orger et al. 2008; Ahrens et al. 2012)) que la larve compense en se mouvant dans la direction de la dérive des barres. Un dernier

exemple de stimulations visuelles consiste à mimer la capture de proie (Bianco, Kampff, and Engert 2011). Une autre manière d'évoquer des captures de proies consiste à introduire des paramécies qui sont ensuite chassées par les larves (Borla et al. 2002; Gahtan 2005).

4-Optogénétique

Les expériences d'optogénétique permettent d'activer ou de rendre silencieux des neurones en temps réel et de façon non invasive (Boyden et al. 2005; Deisseroth 2010). Ces outils en combinant des techniques d'optique et de génétique sont typiquement mis en œuvre sur des animaux semi-restreints ou paralysés (Douglass et al. 2008; Wyart et al. 2009; Schoonheim et al. 2010). Par rapport à la stimulation électrique, cette technique peut être réalisée pendant que les animaux effectuent une tâche comportementale, en utilisant un faisceau de lumière venant d'une LED ou d'un laser. Cette technique a le potentiel de répondre à l'un des grands défis des neurosciences: mettre en relation de façon directe l'activité de neurones avec le comportement d'un organisme. La larve de poisson zèbre, de par sa petite taille et sa transparence est un organisme génétique modèle idéal pour ces expériences. Plusieurs expériences d'optogénétique ont été réalisées chez la larve de poisson zèbre afin de montrer en quoi l'activation des neurones Rohon Beard peut déclencher des réponses de fuite (Douglass et al. 2008), l'activation des cellules Kolmer-Agduhr module la nage lente (Wyart et al. 2009), un réseau présent dans le rhombomère 5 contrôle les mouvements de saccade des yeux (Schoonheim et al. 2010), et que les neurones réticulospinal V2a du hindbrain jouent un rôle critique dans l'excitation des circuits spinaux impliqués dans la locomotion (Kimura et al. 2013).

5-Apprentissage

Quelques paradigmes ont permis de mettre en évidence de la mémoire dès le stade larvaire chez le poisson zèbre. Dans le travail de Aletheia Lee et collaborateurs le rôle de l'habenula dans l'évitement des situations stressantes a été mise en évidence via un conditionnement d'une source lumineuse LED et d'un choc électrique dans un aquarium compartimenté en deux (Lee et al. 2010). Dans le travail de Mark Aizenberg et Erin M. Schuman, le rôle du cerebellum dans l'acquisition et l'extinction mais pas dans la rétention de la mémoire conditionnée a été mis en valeur via un conditionnement d'une stimulation lumineuse et d'un stimulus tactile (Aizenberg and Schuman 2011).

C-L'analyse du comportement spontané de plusieurs larves sur plusieurs minutes pour répondre à des besoins en terme d'analyse du comportement

En nous basant notamment sur les différents types d'expériences comportementales vues précédemment, nous allons maintenant montrer en quoi l'analyse du comportement spontané de plusieurs larves sur plusieurs minutes permet de répondre à des besoins cruciaux en termes d'analyse comportementale pour la larve de poisson zèbre.

1-Méthode de phénotypage de mouvement

Dans les types d'expériences que nous avons décrites précédemment, il est nécessaire de relier le phénotype avec le génotype ou la condition expérimentale (application d'une drogue ou stimulation sensorielle spécifique). Classiquement dans les cribles génétiques, les phénotypes tels que le manque de réponse locomotrice à une stimulation mécanique ou le manque de réponse locomotrice à un changement de lumière ambiante reflétant une cécité étaient identifiés manuellement (Granato et al. 1996; Neuhauss et al. 1999). Les larves du poisson zèbre sont capables à partir de cinq jours de générer des comportements moteurs diverses (Budick and O'Malley 2000). Il est donc capital, au cours du phénotypage d'un mouvement, d'une part de quantifier les paramètres cinétiques (distance parcourue, vitesse, nombre d'oscillations, etc.) et d'autre part d'identifier le type de manœuvre effectuée par la larve. Dans le cadre de ma thèse, nous avons focalisé notre attention sur ces deux points. Bien que d'autres descriptions du comportement peuvent aussi être envisagées (voir VI-B-2 et II-B-3), nous focaliserons sur la description de ces deux types de grandeurs qui nous semblent essentielles dans l'analyse des mouvements.

Il n'existe pas à ce jour de méthodes reconnues, claires et

reproductibles pour réaliser un phénotypage comportementale de cette manière. Il est donc nécessaire de créer une méthode fiable et reproductible permettant de phénotyper un mouvement en fournissant pour celui-ci des paramètres cinématiques globaux et une classification en un des comportements du spectre des manœuvres possibles. Contrairement à d'autres conditions expérimentales (animaux semi-restreint dans le cadre par exemple d'expériences d'optogénétique, animaux soumis à des stimuli extérieurs...), l'observation du comportement spontané des larves permet de mettre en place une méthode de phénotypage non biaisée.

2-Connaissance plus approfondie de la gamme de manœuvres décrites chez la larve de poisson zèbre

Principalement au repos et immobile, la larve du poisson zèbre à partir de cinq jours post-fertilisation se meut sous forme de bouffées natatoires qui arrivent toutes les quelques secondes (Lambert, Bonkowsky, and Masino 2012). Donald M. O'Malley a été un pionnier pour décrire le répertoire de mouvements, dits manœuvres, montrées par la larve de poisson zèbre (Budick and O'Malley 2000). En utilisant des caméras à haute fréquence d'acquisition (typiquement 1000Hz pour les « Escape Response » et 500Hz pour les autres comportements), il a filmé des séquences de mouvements réalisées par les larves de poisson zèbre pendant une seconde après une stimulation mécanique. Des manœuvres spontanées ont aussi été identifiées manuellement. Certains exemples sont présentés dans la Figure 1, Budick et O'Malley les ont caractérisées par diverses variables. Leur analyse consiste à identifier les moments où les oscillations successives de la queue de l'animal atteignent leur maximums et à caractériser ces dernières en terme d'angle, d'amplitude et de position le long de la queue où la courbure est maximale. Ils ont mesuré les temps entre ces différents maximums, vitesse angulaire, direction de l'angle de la tête, distance parcourue, vitesse de nage et

fréquence de battements de la queue. Plusieurs comportements stéréotypés ont ainsi été identifiés, tels que la nage rectiligne ou « Slow Forward Swim » (SFS) pour lequel l'animal nage lentement et en ligne droite, le virage « Routine Turn » (Turn) pour lequel l'animal tourne lentement avant d'avancer, et la réponse de fuite ou « Escape Response » (ER) qui arrive typiquement en réponse à une stimulation intense mécanique (son, touché ou flux de liquide) qui amène l'animal à se retourner très rapidement pour s'enfuir à grande vitesse loin du stimulus. Dans des conditions naturelles, la réponse de fuite est typiquement réalisée lors de la détection d'un prédateur par la larve de poisson zèbre. Les principaux prédateurs des poissons zèbre sont les channidae *Channa*, l'Orphie d'eau douce *Xenentodon cancila* (Hamilton), mais aussi le poisson-chat nocturne *Mystus bleekeri* (Day) ou encore le poisson en forme de couteau *Notopterus*. Des poissons zèbre adultes peuvent aussi s'attaquer à des œufs ou à des larves de poissons zèbre (Spence et al. 2008).

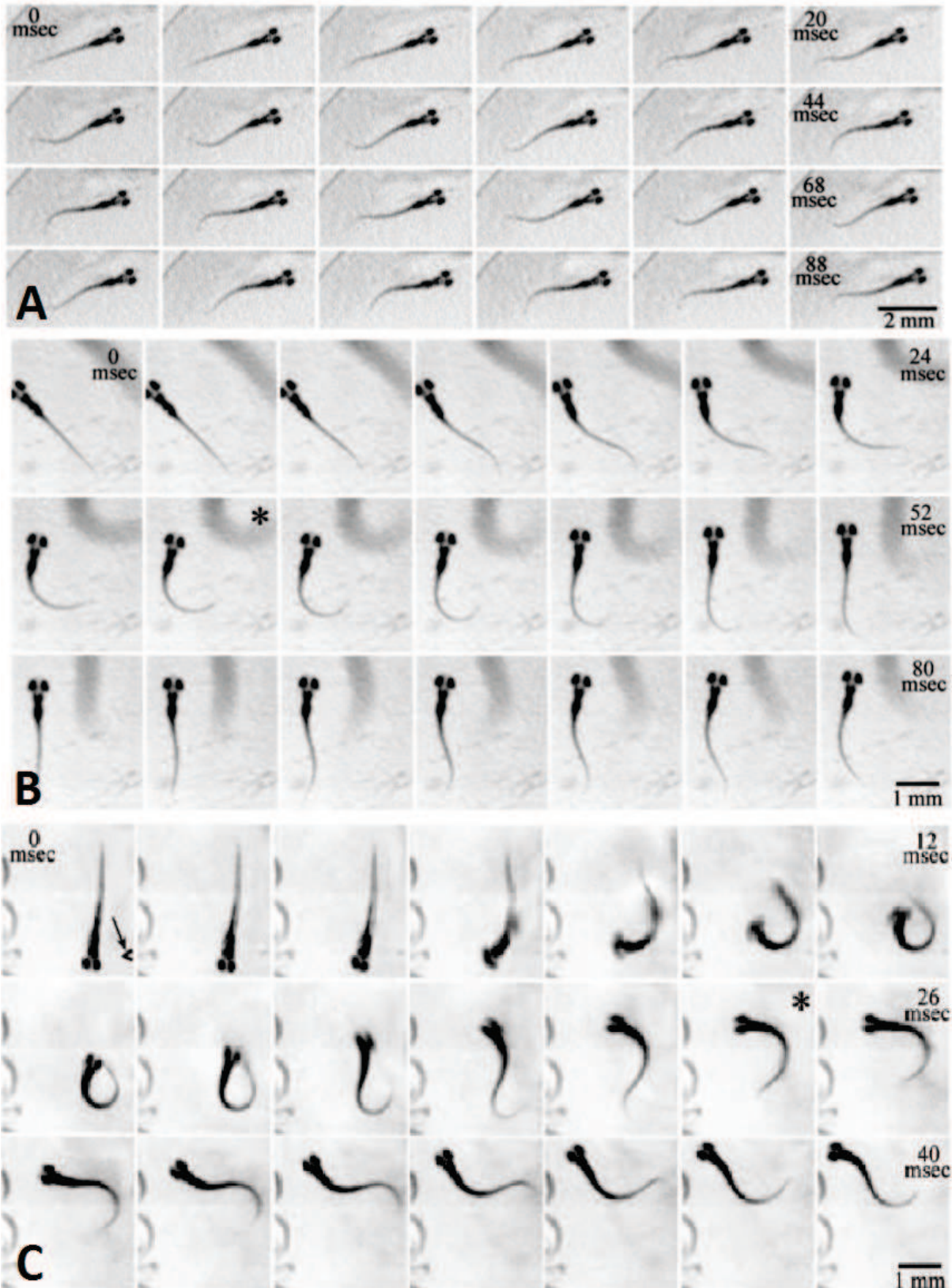


Figure 1: Répertoire Locomoteur de la larve de poisson zèbre. A. Slow Forward Swim. Légères oscillations rostral vers caudal. Faible déplacement latéral de la tête et de l'avant du poisson. Faible distance parcourue. B. Turn. Vitesse angulaire relativement faible. Amplitude angulaire relativement faible du côté du virage et très faible du côté opposé au virage. C. Escape Response. Vitesse angulaire très élevée lors de la première oscillation et forme en C de la queue à la treizième image (asterisk). Le comportement observé ici a été provoqué par une pipette touchant le poisson. Les suites d'images des trois comportements ont été acquises à 500Hz. (Budick and O'Malley 2000)

Le travail méticuleux de Budick et O'Malley représente la base de nos connaissances générales sur le spectre de manœuvres opérées par la larve de poisson zèbre. Néanmoins cette étude n'a pu être réalisée que sur un nombre très limité de mouvements (pas plus d'une dizaine par manœuvre). Afin d'analyser de manière quantitative l'ensemble des comportements locomoteurs de la larve, il est nécessaire d'observer l'ensemble des manœuvres sur plusieurs minutes afin de ne pas seulement se restreindre à quelques mouvements choisis de manière subjective. Une méthode d'analyse portant sur un grand nombre de mouvements réalisés par plusieurs larves spontanément actives semble donc nécessaire pour acquérir une connaissance plus générale du répertoire de comportements locomoteurs de la larve de poisson zèbre.

3- Une méthode générale d'analyse d'expériences comportementales sur un groupe d'animaux

Dans la pratique, le biologiste a besoin d'une analyse automatique des expériences de comportements. Chaque mouvement observé au cours de ces expériences doit être phénotypé en utilisant la méthode de phénotypage décrite précédemment (I-C-1), et le phénotypage de l'ensemble de ces mouvements doit aboutir à une description comportementale globale de l'expérience. Idéalement, des grandeurs telles que les pourcentages de chaque type de comportement réalisé, ou encore les vitesses moyennes et fréquences de battements de la queue pour tous comportements et par type de comportement lui seront très utiles pour décrire le comportement global locomoteur au cours d'une expérience.

De nombreuses expériences sont réalisées chez la larve de poisson zèbre : comportement spontané (I-B-1), crible chimique ou génétique (I-B-2), comportement induit par une stimulation visuelle, chimique, ou mécanique (I-B-3), manipulation optogénétique des réseaux neuronaux (I-B-4), apprentissage (I-B-5) (Lee et al. 2010; Aizenberg and Schuman

2011) . Les besoins en terme de description globale du comportement étant fortement dépendants de l'expérience, l'idéal est donc de mettre au point une méthode assez générale afin que celle-ci soit directement utilisable pour une large gamme d'expériences, et adaptable ou utile aux autres. Pour cela, l'analyse du comportement spontané de larves multiples sur des temps longs (plusieurs minutes) semble idéale.

En effet, le processus de reproduction chez les poissons zèbre est très simple et très rapide et mène à une centaine de larves. Ajouté à la petite taille de ces animaux, les expériences de comportement spontané de plusieurs animaux sur plusieurs minutes sont très simples à mettre en place d'un point de vue expérimental. Elles mènent de plus à l'observation de nombreux comportements différents observés sur de nombreux mouvements réalisés par de nombreux poissons, ce qui permet d'obtenir des résultats riches et robustes d'un point de vue statistique. Pour les expériences de comportement spontané (I-B-1) et pour le cas des cribles chimiques ou génétiques (I-B-2), l'analyse du comportement moteur spontané sur des groupes de larves pendant plusieurs minutes est donc parfaitement adaptée.

Au cas par cas, cette méthode générale d'analyse d'expériences comportementales pourrait être adaptée à l'analyse d'autres types d'expériences (réponses à des stimulus (I-B-3), optogénétique (I-B-4), apprentissage (I-B-5)), et elle pourra aussi être utilisable comme référence pour comparer le comportement observé au cours de ces expériences au comportement spontané.

En conclusion, l'analyse du comportement spontané de plusieurs larves se déplaçant pendant plusieurs minutes :

-serait utile pour la mise en place d'un système de phénotypage de mouvement

-rendrait possible l'acquisition d'une connaissance plus générale de l'ensemble des comportements de la larve de poisson zèbre

-constituerait une première étape dans l'optique de la mise en place d'une méthode générale d'analyse d'expériences comportementales, utilisable dans de nombreux paradigmes, et adaptable ou utile pour les autres (I-C-3)

II- Les moyens d'observation du comportement animal

Nous allons présenter ici les approches mises en place dans le domaine de l'éthologie pour suivre le comportement animal.

A-L'analyse manuelle du comportement

1-Les bases de l'éthologie

L'éthologie est un domaine des neurosciences et de la biologie qui correspond à l'étude du comportement animal. Les premiers éthologistes ont manuellement observé et qualifié les comportements animaux. Lorenz et Tinbergen analysèrent en particulier manuellement le comportement de roulement des œufs chez l'Oie cendrée (Lorenz and Tinbergen 1939). Dans cette expérience, Lorenz et Tinbergen observèrent le comportement très stéréotypé de l'Oie cendrée lorsque celle-ci découvre qu'un œuf s'est échappé de son nid. L'oie ramène alors l'œuf en utilisant son bec pour le faire rouler jusqu'à son nid (Figure 2). Si l'œuf est enlevé du bec de l'animal au cours de la réalisation de ce comportement, l'animal continue quand même de réaliser les mouvements nécessaires au roulement de l'œuf « virtuel » (non-illustré sur la figure). Ils conclurent que certains comportements comme celui-ci peuvent être considérés comme des schémas d'action spécifique (ou « Fixed Action Pattern » (FAP)), c'est-à-dire des comportements innés, composés d'une séquence de mouvements stéréotypée, et qui une fois débutée se poursuit jusqu'à son achèvement sans la nécessité d'un retour sensoriel au cours du mouvement. Ces expériences fondées sur des observations minutieuses a permis l'émergence d'un concept fondateur dans le domaine de l'éthologie.



Figure 2: Comportement de roulement des oeufs chez l'Oie cendrée. L'oie cendrée, assise sur son nid, détecte un œuf hors du nid (a). Elle le fait alors rouler sur lui même en utilisant son bec (b-c-d), jusqu'à le ramener jusqu'à son nid (e-f). (Lorenz and Tinbergen 1939)

2-L'observation subjective du comportement : une approche possible pour des cas simples

Pour des comportements extrêmement stéréotypés, l'observation minutieuse du comportement permet de tirer des conclusions intéressantes. Prenons un exemple plus récent d'expérience comportementale : l'étude réalisée par Helder et al. sur des rats « plongeurs » (Helder, Desor, and Toniolo 1995). Des rats sont placés dans une cage où pour accéder à de la nourriture, ils doivent plonger en apnée jusqu'à une source de nourriture puis revenir dans la cage initiale pour manger le fruit de leurs efforts. Dans cette expérience, Helder et al. ont observé un phénomène de différenciation sociale. Certains animaux dits « transporteurs » vont chercher la nourriture alors que des animaux « non transporteurs » volent la nourriture aux rats transporteurs. Ce dispositif expérimental permet d'étudier le phénomène de différenciation sociale et les mécanismes biologiques qui le sous-tendent. Dans ce paradigme expérimental, une quantification manuelle et subjective est suffisante pour décrire la décision binaire de transporter ou de voler. Chez la larve du poisson zèbre, le criblage génétique visant à identifier des animaux qui répondent ou ne répondent pas au toucher est assez similaire car dans une première simplification, deux sorties comportementales sont possibles (Granato et al. 1996).

3-Les limites d'une quantification manuelle et subjective

Si une estimation manuelle et subjective peut suffire dans des cas relativement simples et stéréotypés, ces cas sont loin d'être la norme. Si nous reprenons l'exemple de la réponse de fuite suite à une stimulation tactile, une larve de poisson zèbre répond rarement de manière stéréotypée et une grande variabilité existe dans le délai, l'amplitude, la durée de la réponse, la fréquence et le nombre d'oscillations (Kohashi and Oda 2008).

Lorsque la larve de poisson zèbre âgée de cinq jours post-fertilisation nage spontanément, elle se meut par bouffées de mouvements qui durent environ 200 ms et sont entrecoupées de périodes immobiles de quelques secondes. Pendant une bouffée de nage, le battement de sa queue peut atteindre 100Hz (Muller 2004). La larve mesure environ 4 mm de long et 0.5 mm de large. En raison de sa vitesse, le mouvement d'une larve de poisson zèbre est difficile à capturer pour l'œil humain, même sous un microscope. Cette tâche est impossible lorsque des dizaines de larves se meuvent ensemble dans le paradigme que nous avons choisi.

Comme nous l'avons vu avec le travail de Don O'Malley, la larve est capable de générer différents types de manœuvres motrices. Au début de ma thèse, nous avons décidé de tester si ces manœuvres étaient stéréotypées ou si elles pouvaient fortement varier en termes de vitesse, de fréquence de battements, de distance parcourue et d'angle. De par leur nombre, leur complexité, et leur temps important d'acquisition, ces paramètres sont impossibles à calculer de façon manuelle sur suffisamment de mouvements.

B-L'apport de l'informatique et l'intelligence artificielle aux neurosciences comportementales

Si l'analyse manuelle du comportement a permis d'identifier des gènes d'intérêt aux débuts du phénotypage des mutants obtenus à partir de cribles chez le poisson zèbre, seulement des altérations massives et complètes ont pu être mises en évidence. Une analyse à haut débit d'une gamme variée de phénotypes requiert une méthode de détection et d'analyse automatique des mouvements. Dans ce but, nous avons décidé dans le cadre de ma thèse de combiner différentes techniques informatiques, issues de l'intelligence artificielle et plus spécifiquement de la vision par ordinateur et du « Machine Learning ».

1-L'apport des caméras rapides et de l'acquisition directe sur disque

Les caméras classiques acquièrent 24 images par seconde et les vidéos créées sont rejouées à la même cadence. Vu que la larve de poisson zèbre réalise des battements de queue qui peut atteindre 100 Hz (Muller 2004), pour capturer l'ensemble de la dynamique du mouvement il est nécessaire de faire appel à des caméras atteignant des cadences supérieures à 300Hz. Budick et O'Malley avaient utilisé la caméra MD4256 (EG&G Reticon, Sunnyvale, CA, USA) qui fonctionne à 1kHz avec une mémoire tampon qui limite les acquisitions à une seconde environ.

Pour notre projet nous avons utilisé des caméras rapides capables d'acquérir des centaines d'images par seconde (Vieworks, South Korea, ref. VC-2MC-M340E0-C). En collaboration avec la compagnie RD Vision, nous avons développé des systèmes de transfert des données direct sur l'ordinateur ce qui permet de ne pas être limité par une mémoire «tampon» de quelques gigabits. Notre système permet ainsi des enregistrements à haute fréquence limités uniquement par l'espace libre sur le disque.

2-La vision par ordinateur et le suivi automatique de mouvements

La vision par ordinateur est une branche de l'intelligence artificielle qui consiste au développement de programmes informatiques capables d'interpréter des données issues d'une caméra. Le but consiste souvent à reconnaître automatiquement divers objets dans un environnement, éventuellement de les suivre au cours du temps, de créer un modèle 3D d'une scène filmée par une caméra, ou encore de restaurer une image de mauvaise qualité. La vision par ordinateur est ainsi utilisée dans de nombreux domaines différents : en médecine pour analyser des images médicales (Müller et al. 2004), dans l'industrie pour le contrôle des processus de fabrication (Malamas et al. 2003), pour la surveillance de personnes (Sage and Young 1999), ou encore dans l'exploration spatiale pour le guidage automatique de véhicule (Matthies et al. 2007).

Dans le cadre des neurosciences comportementales, l'intérêt d'utiliser la vision par ordinateur est d'élaborer un programme informatique qui puisse extraire des données quantitatives décrivant la cinétique du mouvement, et permettant d'en extraire des grandeurs physiques. Ces programmes dits de tracking permettent d'extraire automatiquement de la vidéo l'ensemble des positions prises par les larves au cours du temps dans l'enregistrement : le tracking est donc un suivi du mouvement. Théoriquement, il serait envisageable une fois les vidéos acquises de laisser un expérimentateur suivre les animaux manuellement tout au long d'une vidéo. Néanmoins sur une vidéo de plusieurs milliers d'images avec plusieurs animaux par puits, cette approche amènerait de nombreuses erreurs subjectives et serait impossible à réaliser dans un temps raisonnable. Bien sur, les erreurs logicielles sont possibles, mais contrairement aux erreurs humaines elles sont obtenues à haute cadence et peuvent être quantifiées afin de calculer une valeur statistique d'erreurs. Le développement logiciel prend du temps, mais automatise et systématise l'analyse par la suite sur des temps très courts.

Des programmes de tracking et de phénotypage ont déjà été mis en place chez d'autres modèles animaux simples tels que la drosophile (Branson et al. 2009; Dankert et al. 2009), ou le nématode *C.Elegans* (Swierczek et al. 2011; Fang-Yen et al. 2010). Ces programmes de tracking réalisent un suivi de la locomotion spontanée, soit pour plusieurs animaux à la fois (Branson et al. 2009; Dankert et al. 2009; Swierczek et al. 2011), soit pour des animaux uniques (Fang-Yen et al. 2010; Stephens et al. 2008). Dans une grande majorité des cas, ces programmes de tracking suivent un algorithme par "blob" (Lindeberg and Eklundh 1990), c'est-à-dire qui repose sur l'identification de zones de l'image ayant des propriétés différentes du reste de l'image en termes de couleurs ou de luminosité (ces zones, les "blobs", représentent les animaux suivis au cours du temps). Plusieurs programmes de tracking ont été développés pour le suivi de larves de poisson zèbre : aussi bien pour le comportement spontané de plusieurs poissons sur plusieurs minutes (Noldus, Spink, and Tegelenbosch 2001; Lambert, Bonkowsky, and Masino 2012), que pour le comportement de plusieurs poissons enregistré sur une période très courte (1 seconde) après un changement de luminosité (Burgess and Granato 2007), que pour des larves semi-restreintes (queue battant librement et tête immobilisée dans un gel d'agar) (Bianco, Kampff, and Engert 2011).

3-Statistique globale sur les paramètres du mouvement

Une fois le suivi des mouvements réalisé, l'étape suivante consiste à en extraire des quantifications des paramètres cinétiques globaux du mouvement telle que la vitesse, la distance parcourue, le temps de parcours, ou la fréquence de battement de la queue.

Ces mesures peuvent être calculées sur l'ensemble des mouvements ou bien par animal. En effet, à l'instar du nématode ou de la drosophile, les larves de poisson zèbre se déplacent par bouffées natatoires, événements discrets séparés par des périodes de repos où l'animal est

immobile. Ainsi il est possible de calculer des valeurs moyennes de ces paramètres par bouffée natatoire.

Les paramètres cinétiques indiqués ci-dessus permettent de quantifier les caractéristiques de la motricité des larves. Il est possible de mesurer d'autres grandeurs reflétant les interactions entre larves telles que la distance entre animaux, la fréquence de contacts entre animaux, ou la durée des contacts. De la même façon, il est possible de calculer le temps passé dans une zone plutôt que dans une autre (dans le cas par exemple de la préférence lumineuse (Ahrens et al. 2013)).

Une estimation des paramètres généraux (distance et temps de parcours par mouvements) a déjà été exploitée dans plusieurs études telles que Lambert et collaborateurs (Lambert, Bonkowsky, and Masino 2012). Les sociétés commerciales tel que ViewPoint ou Noldus (<http://www.viewpoint.fr/content.php?content.72>;

<http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/daniovision>)

(Noldus, Spink, and Tegelenbosch 2001) proposent des systèmes fondés sur l'utilisation de caméras à 60Hz où les battements rapides de la queue ne peuvent être suivis et seule la position de la tête est identifiée. Des paramètres tels que la distance parcourue, la vitesse moyenne, le temps passé à nager et l'activité motrice globale peuvent être estimés sur des temps très longs (jusqu'à plusieurs heures voir plusieurs jours) à partir de ces données. Le système de la société ViewPoint, a permis dans l'étude de J. Rihel et collaborateurs de suivre le mouvement des animaux sur des temps de plusieurs heures afin d'étudier le sommeil. Cette étude a ainsi permis d'établir l'effet d'un grand nombre de drogues par une analyse de clusters en se basant sur les périodes d'inactivité et leur durées, les temps de latence des périodes de repos, les distances parcourues moyenne, et les activités totales moyenne (J. Rihel et al. 2010) (Figure 3). Ce système a également permis à KJ Webb et collaborateurs de quantifier les changements dans les préférences de positionnement dans l'espace après administration d'amphétamine chez le poisson adulte (Webb et al. 2009).

Cette approche globale a également été utilisée dans bien d'autres expériences comportementales portant sur la larve de poisson zèbre (Elbaz et al. 2012; Jason Rihel and Schier 2012).

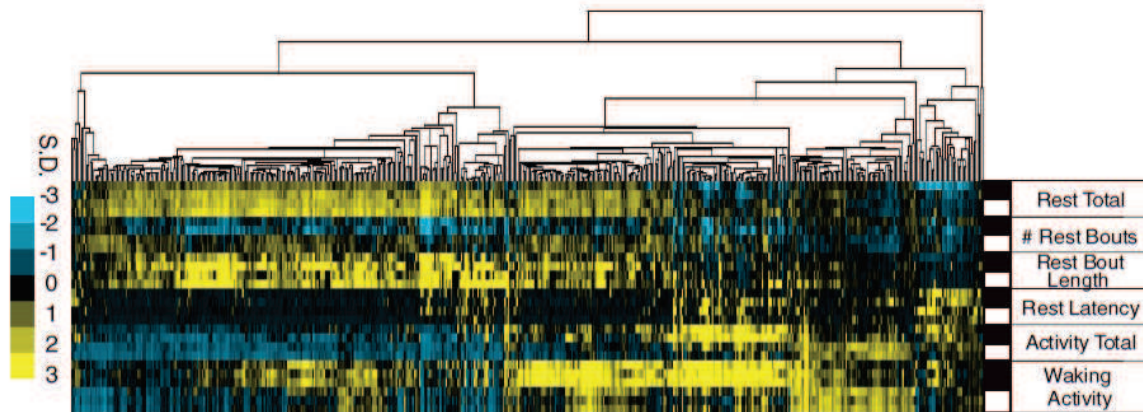


Figure 3: Clustering hiérarchique liant différents composés chimiques en se basant sur des paramètres globaux. Chaque ligne correspond à un paramètre et chaque colonne à un composé chimique. Les couleurs représentent l'écart de la moyenne du paramètre en question à la moyenne des contrôles (jaune: moyenne plus élevée que les contrôles; bleu: moyenne plus faible que les contrôles). L'arbre en haut de la figure (ligne horizontale et verticale en haut de la figure) quantifie les similarités entre composés chimiques: plus deux composés chimiques sont proches dans l'arbre, plus ils sont similaires en terme d'effet comportemental. (J. Rihel et al. 2010)

4-Algorithmes de Machine Learning et reconnaissance de comportements

Cette mesure de l'activité motrice est extrêmement utile dans de nombreux cas et permet d'avoir une première vision du comportement global d'un organisme génétique modèle. Mais ces paramètres globaux ne rendent pas compte de la grande gamme de manœuvres exhibées par la larve de poisson zèbre et une partie qualitative de l'information est donc perdue.

Néanmoins, certains scientifiques avec une formation en informatique ont développé des systèmes d'identification automatique de comportements stéréotypés. Lors de sa thèse, Dr. Kristin Branson a mis en place un système de suivi automatique de drosophiles en 2D, à partir duquel des manœuvres stéréotypées sont identifiées grâce à une procédure de classification supervisée (Branson et al. 2009; Kabra et al. 2012) (Figure 4). La classification supervisée, une technique de machine learning (une des branches de l'intelligence artificielle), consiste à créer un outil informatique capable de fixer des labels distincts à des données fournies en entrée : pour un ensemble de variables fixées représentant un objet, cet outil réalise des calculs en se basant sur un modèle préalablement appris afin de déterminer à quelle catégorie appartient cet objet. Le terme « supervisé » signifie que la procédure d'apprentissage utilise des données pour lequel les labels sont connus et déterminés au départ. Dans le travail de Branson, pour le mouvement de chaque animal le programme Ctrax peut nommer quel comportement a été réalisé à un moment donné. Les mouches ont leurs ailes coupées afin de les maintenir en 2D. Les comportements pouvant être détectés alors par ce programme sont : la marche, l'arrêt, la marche « en crabe », la marche arrière, le saut, le contact avec une autre drosophile et la poursuite. Branson démontre l'utilité de ce programme en montrant que celui-ci est capable de prédire des informations plus complexes telles que le génotype *fruitless*

ou le sexe de l'animal en se basant sur l'analyse de ces catégorisations.

Les différentes méthodes de classification supervisée sont expliquées et comparées plus en détail dans la partie V-A-4. Dans le cas de la larve de poisson zèbre, celles-ci peuvent permettre de classifier chacun des mouvements détectés en une manœuvre donnée, afin de phénotyper chaque mouvement.

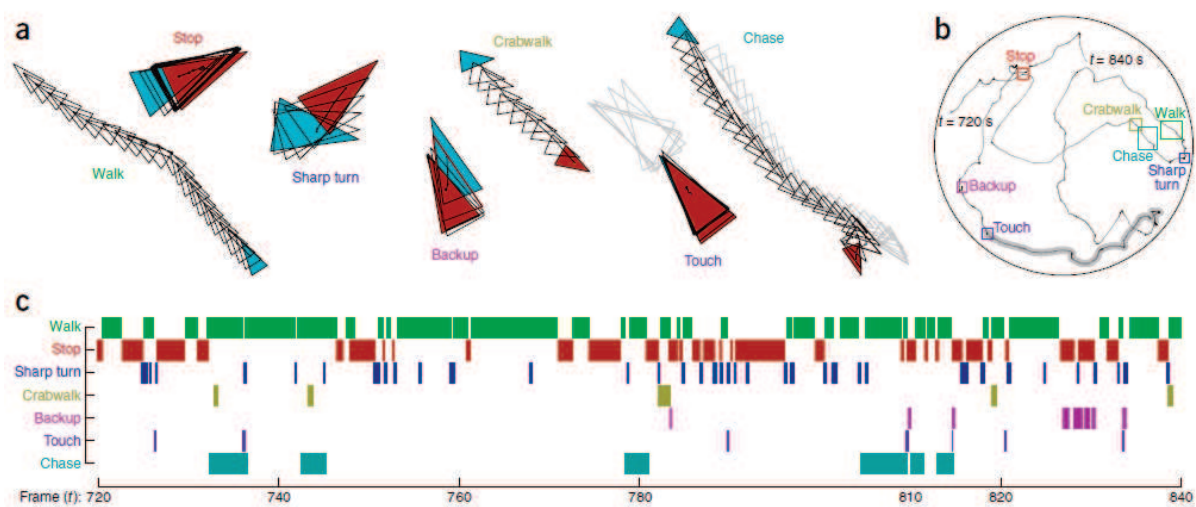


Figure 4: Répertoire Locomoteur de la drosophile. (a). Exemples de comportements détectés (depuis les trajectoires en (b)). Les triangles indiquent les positions de la drosophile pour chaque image. Les triangles cyan indiquent le début des mouvements et les triangles rouges la fin des mouvements. Pour les comportements de chasse (chasing) et de contact (touching), les positions de l'autre drosophile sont indiquées en gris. (b). Trajectoire d'une drosophile mâle enregistré pendant 2 min au sein d'une arène comprenant plusieurs drosophiles. Les carrés de couleurs correspondent aux comportements de (a). (c). Classification du comportement de la drosophile de (b) pendant les 2 min d'enregistrement. (Branson et al. 2009)

C-Paradigme expérimental pour l'analyse à haut débit des mouvements spontanés chez la larve de poisson zèbre

Si l'approche manuelle de l'analyse du comportement a ses limites, l'informatique et l'intelligence artificielle donnent l'espoir de réaliser une analyse fine et haut débit sur les manœuvres motrices. Après avoir défini le paradigme de l'analyse de mouvements spontanés à haut débit, nous verrons en quoi celui-ci permet grâce à l'informatique et l'intelligence artificielle de répondre au besoin d'analyse du comportement spontané de plusieurs larves se déplaçant pendant plusieurs minutes (I-C).

1-Un paradigme d'analyse de mouvements spontanés à haut débit

Le paradigme que nous avons mis en place a deux objectifs :

1- Suivre le comportement spontané des larves en groupe

2- Analyser les manœuvres à haut débit : l'expérience doit porter sur un nombre important d'animaux et sur une durée permettant de suivre des milliers de mouvements. Comme vu précédemment, l'analyse des mouvements de façon manuelle est trop limitée et elle doit au contraire être réalisée de façon rapide et simple grâce à l'informatique et l'intelligence artificielle pour faire le suivi (tracking), l'analyse des paramètres cinétiques mesurés par bouffée natatoire et la catégorisation des différentes manœuvres.

Ce paradigme rend possible l'analyse du comportement spontané de plusieurs larves sur plusieurs minutes et peut donc permettre la réalisation des trois objectifs précédemment fixés:

1-La mise en place d'un système de phénotypage de mouvement (I-C-1): l'analyse spontanées a l'avantage d'être non-biaisée et l'automatisation du phénotypage grâce aux techniques informatiques rend possible la création d'une méthode de phénotypage claire et reproductible

2-L'acquisition d'une connaissance plus générale de l'ensemble des comportements de la larve de poisson zèbre (I-C-2) : Les expériences sur l'activité locomotrice spontanée à haut débit permettent de collecter une grande quantité de données riches et diverses sur la locomotion libre des larves et les manœuvres réalisées.

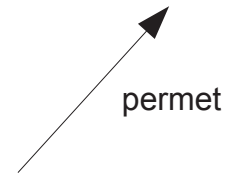
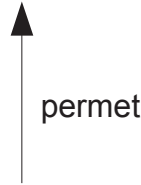
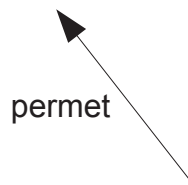
3-Ouvrir la voie à la mise en place d'une méthode générale d'analyse d'expériences comportementales, utilisable dans de nombreux paradigmes, et adaptable ou utile pour les autres (I-C-3) : Ce paradigme d'analyse haut-débit de mouvements spontanés pourra être directement utilisé pour tester par exemple l'effet de drogues ou de mutations sur le répertoire spontané de nage; et il pourra être adapté à des expériences de comportement induit, d'optogénétique, ou d'apprentissage, ou encore servir de référence à celles-ci.

Voici ci-dessous (Figure 5) le résumé de notre approche justifiant l'intérêt d'un système d'analyse haut débit des mouvements spontanés des larves de poisson zèbre en groupe.

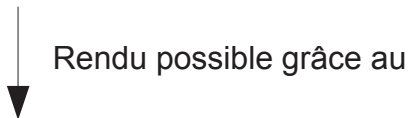
1) Mise en place d'une **méthode de phénotypage de mouvement** fournissant type de comportement et paramètres décrivant la dynamique du mouvement

2) Acquisition d'une **connaissance plus générale de l'ensemble des comportements** de la larve de poisson zèbre.

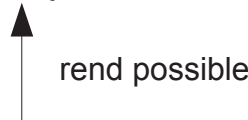
3) Mise en place d'une **méthode générale d'analyse d'expériences comportementale** (utilisant la méthode du besoin n°1) : utile pour de nombreuses expériences, et adaptable ou utile pour d'autres expériences.



L'analyse du comportement spontané de plusieurs larves sur plusieurs minutes.



Paradigme spontané et haut débit qui rend possible l'analyse automatique du comportements spontané des larves de poissons zèbre, en se basant sur plusieurs dizaine de larves différentes filmé sur plusieurs minutes produisant des milliers de mouvements identifié et analysé automatiquement grâce à l'informatique et à l'intelligence artificielle.



L'informatique et l'intelligence artificielle permettent de surpasser les limitations de l'analyse manuelle du comportement.



L'analyse manuelle du comportement animal est rapidement limité, en particulier dans le cas de la larve de poisson zèbre.

Figure 5: Résumé de la démarche démontrant l'utilité de la mise en place d'un système d'analyse spontané et haut débit du comportement de la larve de poisson zèbre.

2- Etat de l'art des systèmes d'analyse à haut-débit de comportement spontané

Plusieurs systèmes ont déjà été créés pour analyser à haut-débit le comportement spontané de la larve (Tableau 1). EthoVision de la société Noldus et Viewpoint sont des systèmes commerciaux qui permettent une analyse à haut débit des comportements (<http://www.viewpoint.fr/content.php?content.72>; <http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/daniovision>) (Noldus, Spink, and Tegelenbosch 2001). Néanmoins, ces systèmes acquièrent des données à faible cadence (60Hz maximum) et ne permettent pas de suivre finement la dynamique des mouvements, ou encore moins de reconnaître les différentes manœuvres développées par les larves. En ne suivant que le centre de masse des larves à faible fréquence (sans suivre la queue), ces systèmes ne donnent des informations que sur la distance parcourue, la vitesse, le temps passé à nager ou la localisation des animaux dans l'espace. Aucune information quantitative fine sur le mouvement ne peut être estimée et il n'est pas possible de catégoriser les manœuvres automatiquement.

Plusieurs programmes non commerciaux ont vu le jour. À partir de Ctrax développé par Kristin Branson sur le suivi de drosophiles en 2D, Masino et ses collaborateurs ont adapté un logiciel de suivi de plusieurs larves sur plusieurs minutes. Dans leur système, la fréquence d'acquisition n'est que de 60Hz et seuls des paramètres de position et de vitesse sont estimés (Lambert, Bonkowsky, and Masino 2012). Burgess et Granato ont développé le logiciel FLOTE qui suit la position de la queue à partir d'une segmentation en trois éléments sur des vidéos acquises à plus de 1000Hz. En revanche leur approche ne fonctionne que sur une période temporelle de seulement quelques millisecondes (Burgess and Granato 2007).

	DanioVision (de Noldus)	ZebraBox (de ViewPoint)	Flote (de Burgess et Granato)	Adaptation de Ctrax (de Masino et al.)
Setup				
Fréquence d'acquisition	60 Hz	<60Hz	1000 Hz	60 Hz
Nombre de boîtes de pétri	6, 12, 24, 48, ou 96	6, 12, 48, ou 96	1	1
Nombre de poissons	-	96 maximum	Typiquement 24	10
Résolution spatiale	-	-	512 x 512 pixels	-
Taille de la (des) boîte(s) de pétri	14,5 x 13 cm au total (toutes boîtes de pétri juxtaposée s)	Taille fixe quel que soit le nombre de boîtes (comme DanioVision)	6 cm de diamètre	5 cm de diamètre
Temps d'acquisition	-	7 jours maximum	400, 500 ou 1000 ms	10 min
Tracking	Centre de masse	Centre de masse	Centre de la tête; Queue suivie de manière simplifiée: modélisation de la queue avec trois segments	Centre de masse
Paramètres Globaux fournit	Vitesse; Distance	Vitesse; Distance	Amplitude de la première oscillation;	Distance totale

	parcourue; Angle de virage	parcourues; Temps de parcours	Distance et temps de parcours; fréquence de battements de la queue; vitesse angulaire maximum; moyenne de la variation de l'axe principale de la tête...	parcourue par larve; moyenne de la durée d'un épisode de nage, par larve
Catégorisation	Aucune	Aucune	Classification linéaire simple (2 paramètres utilisés) en SFS vs Turn; Pas de preuves que tous les mouvements observés sont catégorisés	Aucune

Tableau 1: Comparatif des systèmes existants d'analyse haut-débit du comportement spontané (-: informations non fournies)

3-Limites des systèmes existants et création de ZebraZoom

Les systèmes précédemment cités utilisent soit des caméras à très haute fréquence (1000 Hz dans le cas de Burgess et Granato) mais sur seulement quelques centaines de millisecondes; soit sur plusieurs minutes, mais à une fréquence trop faible pour suivre finement les mouvements des larves (60Hz pour les systèmes de Noldus, ViewPoint, et pour l'adaptation de Ctrax par Masino et collaborateurs). Pour pouvoir atteindre les objectifs précédemment établis, il est nécessaire de recueillir suffisamment de données et il faut pour cela enregistrer le comportement sur plusieurs minutes. Mais afin de pouvoir suivre finement le comportement des larves et notamment les mouvements de leurs queues, il est aussi nécessaire d'adopter une fréquence d'acquisition suffisamment importante (supérieure à 300 Hz). Les battements de queue peuvent en effet atteindre 100Hz et il faut donc se placer à une fréquence bien supérieure pour pouvoir suivre finement la queue au cours du temps.

Le suivi de la queue des larves au cours du temps permettra également de mieux comprendre comment les mouvements de queue permettent de déterminer le type de comportements réalisés. Cela permettra donc par la suite de créer des systèmes de phénotypage pour les expériences dans lesquelles la larve de poisson zèbre est semi-immobilisée avec la tête confinée dans le gel d'Agar et la queue libre (Wyart et al. 2009; Bianco, Kampff, and Engert 2011).

Afin de pouvoir comparer différentes conditions (poissons mutants vs contrôle par exemple dans le cadre du troisième objectif), il est également nécessaire de pouvoir analyser les comportements réalisés dans plusieurs boîtes de pétri en même temps (comme dans les systèmes commerciaux précédemment cités).

En résumé, voici les caractéristiques minimales que nous avons fixés pour notre système d'analyse du mouvement des larves de poisson zèbre haut-débit :

<p><u>-Dispositif Expérimental et Tracking:</u></p> <ul style="list-style-type: none">-Nage Spontané-Tracking sur plusieurs minutes-Tracking sur plusieurs animaux-Tracking de la queue des animaux-Vidéo acquise à hautes-fréquence (>300Hz) <p><u>-Analyse Comportementales:</u></p> <ul style="list-style-type: none">-Quantification par paramètres globaux-Classification automatique <p><u>-Validation Rigoureuse</u></p> <ul style="list-style-type: none">-Validation de l'algorithme-Test du système sur des exemples biologique concret

Tableau 2: Objectifs fixés sur l'étude du comportement des larves de poissons zèbre.

A notre connaissance, aucun des systèmes disponibles actuellement ne répond à ces exigences. Nous avons donc décidé de créer notre propre programme ZebraZoom afin de répondre à l'ensemble de ces exigences. Comme nous le montrerons dans les trois chapitres suivants, notre programme permet de suivre individuellement chaque larve de poisson zèbre dans un groupe; il quantifie automatiquement les caractéristiques de leur mouvement; et enfin il réalise une catégorisation en différentes manœuvres stéréotypées. Nous présenterons le principe de ce programme et sa validation. Nous montrerons des applications intéressantes sur l'analyse de drogues agissant sur les récepteurs aux neurotransmetteurs, l'analyse de mutants aveugles *atoh7* et l'étude des interactions entre larves au sein d'un même groupe.

III-Les bases de ZebraZoom : dispositif expérimental, suivi et détection de mouvements

Je vais d'une part présenter le montage expérimental que nous avons mis en place avec Jenna Sternberg, alors étudiante en master, et la société RD Vision (Saint Maur des Fossés, France). Puis je détaillerai la première étape de ZebraZoom qui consiste à suivre chaque larve et à détecter leurs mouvements.

A-Dispositif expérimental

1-Poissons zèbre

Toutes les expériences que nous avons réalisées à titre de test et de validation de notre logiciel ont été réalisées sur des larves de poisson zèbre, aussi appelé *Danio Rerio*, âgées de cinq à sept jours. Avant 4dpf, la larve nage de manière "immature": à haute fréquence de battements de la queue et pendant de longues périodes (Buss et Drapeau 2000). A 4dpf, la vessie natatoire n'est pas encore suffisamment gonflé et la larve ne peut souvent pas se tenir droite. Entre 5 et 7 dpf, il n'y a pas de différences très significatifs au niveau des comportements observés, ce qui explique notre choix d'utiliser des larves de cet âge. Par défaut, dans un premier temps, nous conseillons d'utiliser cette fourchette d'âge pour réaliser des expériences, bien que le système pourrait tout à fait être adapté à d'autres âges. De la fertilisation de l'oeuf jusqu'au moment où nous avons enregistré leur comportement, les embryons et les larves de poisson zèbre ont été maintenues dans un incubateur à 28,5 °C avec un cycle de 14 heures de jour de 10 heures de nuit (lumières allumées à huit heures le matin et éteintes à 10 heures le soir). Toutes les procédures réalisées sur les larves de poisson zèbre ont été approuvées par le comité d'éthique à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière.

2-Enregistrements du comportement

Toutes les expériences que nous avons effectuées ont eu lieu entre deux

et cinq heures de l'après-midi. Les larves de poisson zèbre étaient placées dans des boîtes de pétri de 2,2 cm de diamètre interne et de 3,5 cm de diamètre externe (Figure 7 Figure 8). Ces boîtes de pétri étaient remplies d'une solution d'eau bleue (contenant du bleu de méthylène à 0.5 ppm). Le niveau d'eau a toujours été maintenu assez bas (environ 2 mm de hauteur) afin de fortement limiter le nombre de croisements entre larves de poisson zèbre, et pour que l'on puisse donc considérer que les mouvements ont lieu en 2D. En se basant sur quatre vidéos représentant un total de 720 secondes et 28 larves filmées, un expérimentateur a manuellement estimé qu'un croisement avait lieu en moyenne toutes les 109 s (0.0069 ± 0.0019 fois par seconde).

Pendant un enregistrement, nous filmions en général 8 boîtes de pétri en tout, et nous placions 7 larves de poisson zèbre par boîte de pétri. Typiquement, nous filmions donc 56 larves de poisson zèbre simultanément. Ces boîtes de pétri étaient placées sur une table de lumière homogène dont l'intensité lumineuse était de 0.78 mW/cm^2 (Phlox, ref. LEDW-BL-200/200-LLUB-Q-1R24). Les larves de poisson zèbre étaient acclimatées pendant une heure à cette table lumineuse ainsi qu'à la température de la pièce (21-22 °C). Après cette période d'acclimatation, les enregistrements de comportement ont été réalisés pendant des périodes de 4 minutes à 337 Hz grâce à une caméra rapide CMOS ayant une résolution de 2048x1088 pixels (Vieworks, South Korea, ref. VC-2MC-M340E0-C) couplé à un objectif (AF Nikkor 50 mm f/1.8D, Nikon, Japan) placé au-dessus de la table lumineuse (Figure 6). Ce système d'acquisition d'images à haute vitesse est géré par le logiciel HIRIS (RD Vision, France) et est capable de faire des acquisitions de longue durée en streaming mode.



Figure 6: Dispositif Expérimental. Huit boîtes de pétri, placées sous une table de lumière homogène avec une intensité lumineuse de 0.78 mW/cm^2 , sont filmées par une caméra rapide (à 337 Hz), pendant 4 minutes

B-Algorithmes de Tracking

1-Tracking de la tête des poissons zèbre

Etant donné le nombre important d'images à traiter, nous avons choisi d'utiliser le langage C++ afin d'obtenir un programme efficace en terme de temps d'exécution. Nous utilisons également la librairie open source nommée *openCV* afin de profiter des nombreuses fonctions implémentées liées à la vision par ordinateur (<http://opencv.org/>).

La toute première étape consiste à identifier la position des huit boîtes de pétri. Ceci est réalisé en utilisant une technique basée sur la transformée de Hough (Duda and Hart 1972) (Figure 8). Ensuite, le même algorithme de tracking va être appliqué sur chacune des huit différentes boîtes de pétri. Comme mentionné dans la partie II-B-2, la plupart des systèmes de tracking mis au point jusqu'à présent pour suivre des animaux modèles simples (tels que la larve de poisson zèbre, le *C.Elegans* ou encore la drosophile) reposent sur des algorithmes "par blob" (Lindeberg and Eklundh 1990). Nous avons de même mis en place un système de tracking "par blob" que nous allons maintenant détailler.

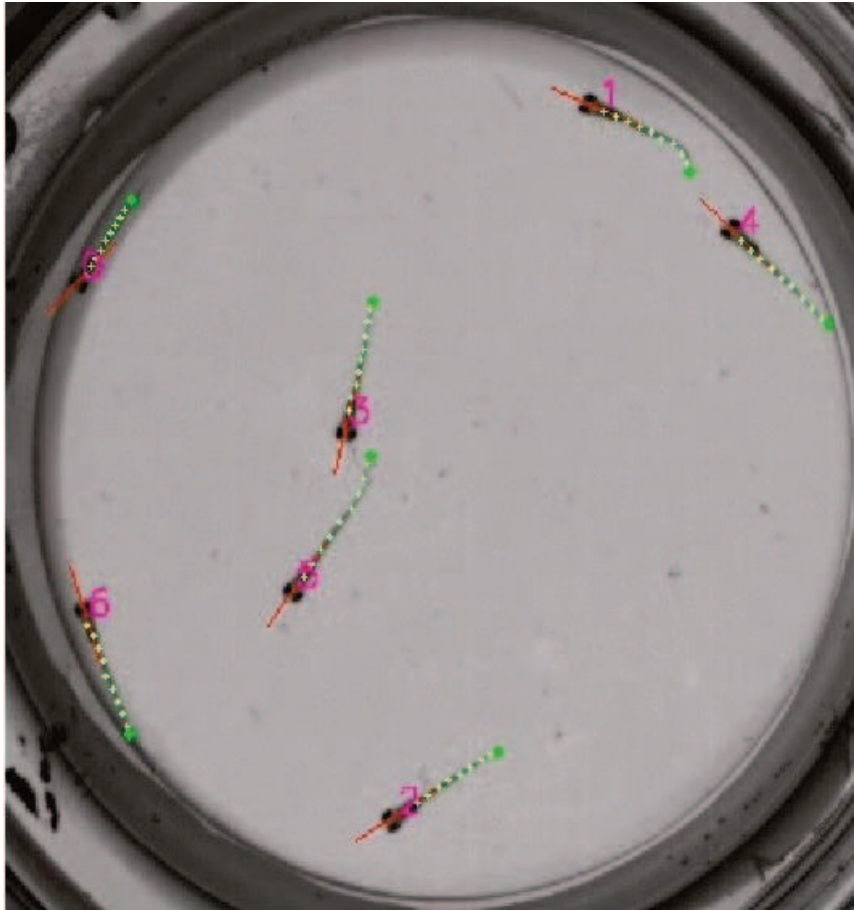


Figure 7: Exemple de tracking sur une boîte de pétri d'une image d'une vidéo. Les numéros au niveau de chaque tête de poisson permettent d'identifier le poisson au cours du temps. Les axes rouges marquent l'axe des poissons et les points vert la queue des poissons.

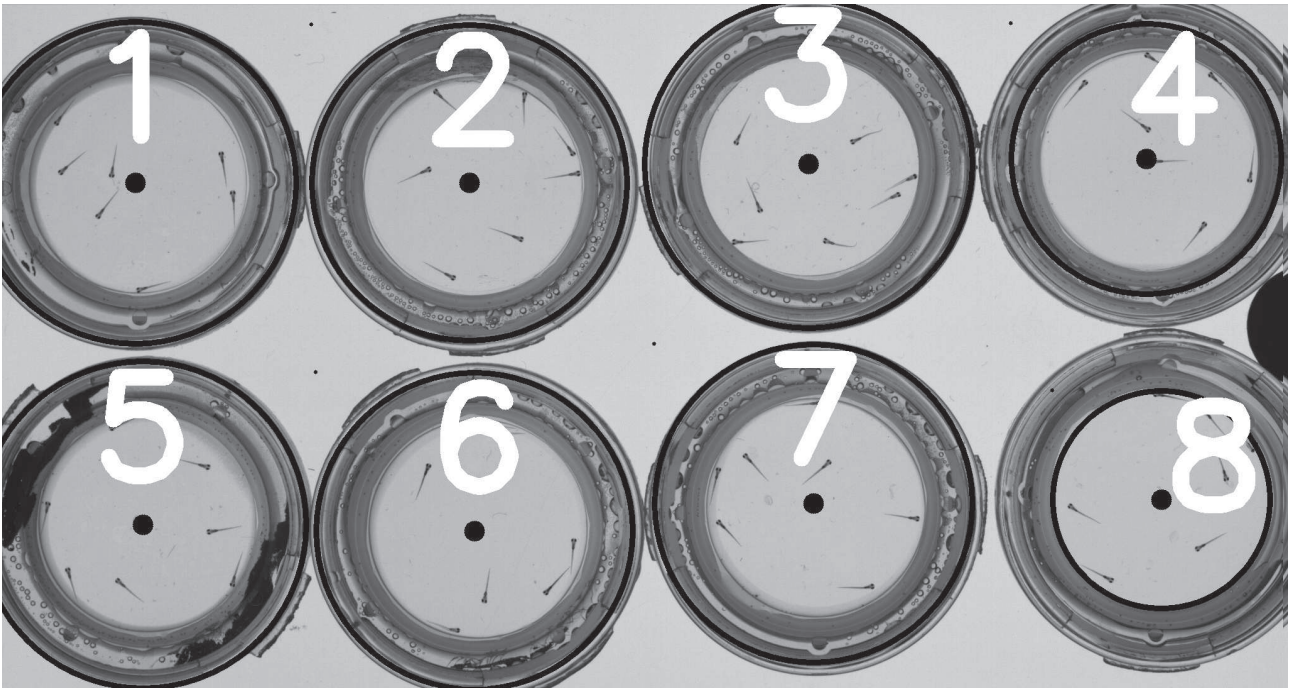


Figure 8: Détection automatique des huit boîtes de pétri grâce à la transformée de Hough. Les points noirs représentent les centres détectés et les cercles noirs les périmètres détectés.

La méthode de tracking commence par l'identification et le suivi de la tête des larves de poisson zèbre. D'un point de vue anatomique, il s'agit en réalité du suivi de la tête, du tronc, et de la vessie natatoire de la larve de poisson zèbre. Mais afin de simplifier les explications, nous ferons référence à cette partie du poisson zèbre en l'appelant tout simplement la « tête » du poisson zèbre.

L'algorithme de tracking de la tête des larves commence par l'identification du fond de la boîte de pétri (Figure 9B). Ceci est réalisé en calculant pour chaque pixel, la valeur maximum de ce pixel sur toutes les images constituant la vidéo. En effet, lorsqu'un poisson passe dans une zone de la boîte de pétri, cela a pour effet d'assombrir cette zone de l'image. En prenant la valeur maximum des pixels (ce qui correspond aux pixels les plus claires) on obtient donc la valeur du pixel lorsqu'il n'y a aucune larve sur cette zone de l'image. Cette méthode permet donc d'extraire le fond d'une vidéo à condition que pour chaque zone de la boîte de pétri, il existe au moins un moment pendant la vidéo où il n'y a aucune larve dans cette zone. Cette méthode ne fonctionne donc pas si un poisson reste immobile tout au long de

la vidéo. Outre le fait que cela soit très rare, si cela arrive la larve fera parti du fond de l'image, et elle ne sera donc pas détectée, mais ceci n'est pas problématique puisque celle-ci ne bouge pas.

Une fois le fond détecté, la même procédure est appliquée à chacune des images constituant la vidéo. Cette procédure commence par la soustraction du fond de la vidéo à l'image en question (Figure 9C). À ce stade, l'image comprend donc des poissons avec leurs pixels initiaux, sur un fond blanc. L'image est ensuite binarisée, ce qui permet d'aboutir à une image contenant les poissons en noir, et le fond en blanc (Figure 9D). Deux filtres d'érosion avec un élément rectangulaire de 3*3 sont ensuite successivement appliqués à cette image, ce qui permet d'obtenir une image contenant la tête des poissons en noir et le fond de l'image en blanc (Figure 9E). Sur cette image, les composantes connexes (surface noire) sont identifiées automatiquement. Celles qui ont une aire adéquate (entre 0.0871 et 0.8712 mm²) sont considérées comme représentant la tête d'une des larves. Les centres de masse des composantes connexes sélectionnées sont ensuite calculés, ces derniers représentent le centre de la tête des larves (Figure 9F).

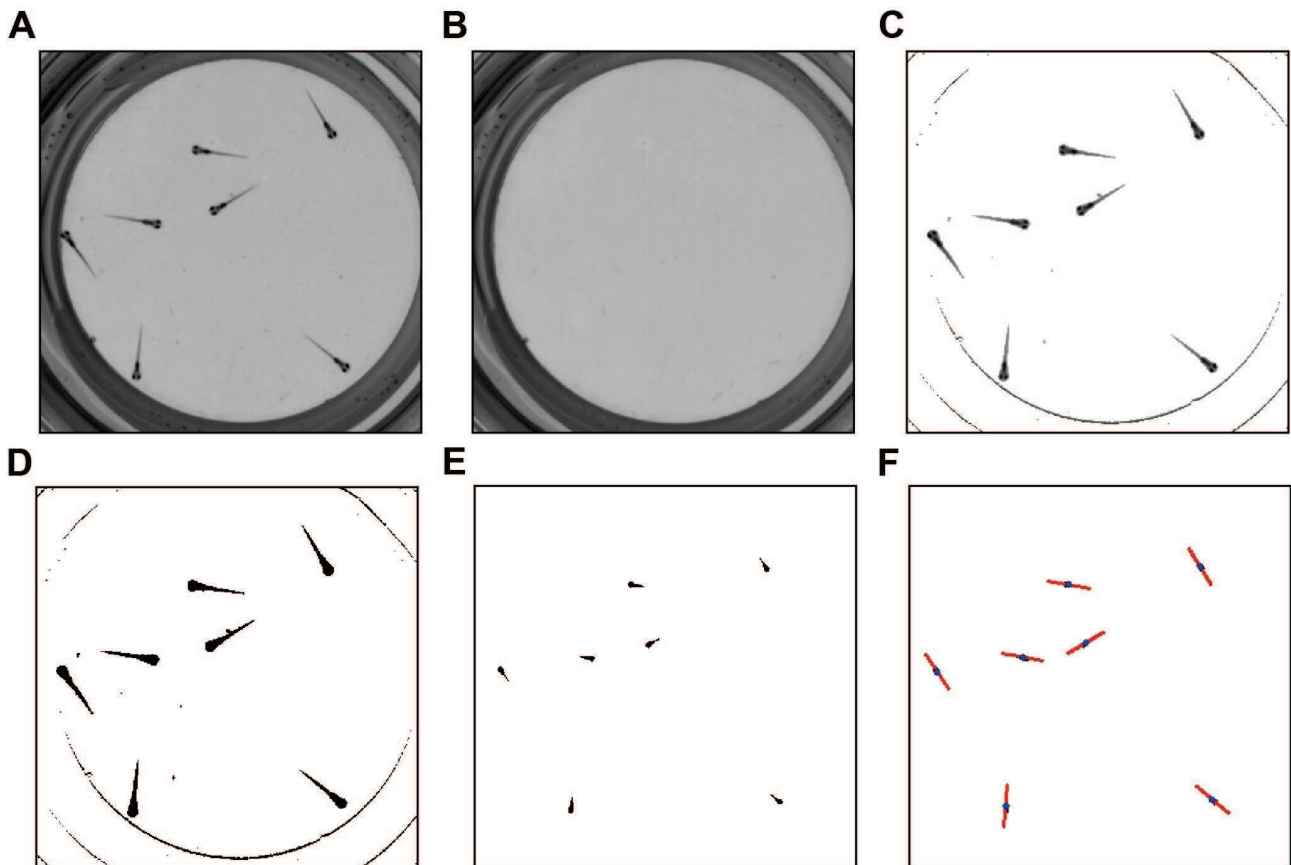


Figure 9: Algorithmes de tracking du centre de la tête des animaux. A. Image Initiale. B. Fond. C. Fond soustrait. D. Image seuillé. E. Image érodé. F. Détection des centres et des directions principales

A ce stade, l'algorithme possède donc pour chaque image de la vidéo des positions possibles de larves de poisson zèbre, mais ce n'est pas pour autant qu'il peut suivre une larve d'une image à l'autre : les positions de chacun sont connues mais pas les liens. Reste donc à déterminer ces liens. Pour cela, l'algorithme calcule pour chaque image des estimations de la position des différentes larves de poisson zèbre en se basant sur les images précédentes grâce à un modèle cinématique. Pour chaque larve, on calcule les distances entre l'estimation de position pour la larve en question et les différentes positions possibles de larves pour cette image. En trouvant la distance minimale on réalise le lien entre deux images consécutives. Plus précisément :

En supposant que les positions P des larves de poisson zèbre sont connues au temps T :

$$P_T = \{X_1^T; \dots; X_n^T\}$$

Avec X_i la position du poisson i.

On suppose qu'on connaît P également pour des temps inférieurs à T (P_{T-1} , P_{T-2} ...)

On peut alors calculer les prédictions de position au temps T+1 grâce à un modèle cinématique :

$$E(P_{T+1}) = \{Y_1^{T+1}; \dots; Y_n^{T+1}\}$$

Avec Y_i la prédiction de position pour le poisson i.

On suppose également que les observations O au temps T+1 sont connues :

$$O_{T+1} = \{o_1^{T+1}; \dots; o_V^{T+1}\}$$

On calcule alors pour toutes larves i, le numéro j_i correspondant à l'observation qui y est associé au temps T+1.

$$j_i = \operatorname{argmin}_{k \in [1; V]} (|Y_i^{T+1} - o_k^{T+1}|)$$

Et nous pouvons ainsi trouver la position de la larve i au temps T+1:

$$X_i^{T+1} = (o_{j_i}^{T+1} + Y_i^{T+1})/2$$

On peut ainsi suivre les larves d'une image à l'autre.

En se basant sur les moments des composantes connexes (jusqu'au second ordre), l'algorithme va ensuite calculer l'axe principal de la tête de la larve (en rouge sur la Figure 9F).

2-Tracking de la queue des larves de poisson zèbre

A ce stade, le programme peut donc suivre la position de la tête de chacune des larves tout au long de la vidéo. Afin d'obtenir l'information la plus complète possible sur les mouvements des larves de poisson zèbre nous voulons également pouvoir suivre la queue de ces larves au cours du temps.

Pour cela, pour chaque larve, nous appliquons un algorithme spécifique pour chaque image. Cet algorithme se fonde sur l'image binarisée évoquée précédemment (Figure 9D). Cette image contient différentes composantes connexes dont certaines correspondent à la silhouette de la tête et de la queue des larves de poisson zèbre. Sur cette image, on commence par identifier la composante connexe correspondant à la larve d'intérêt (il s'agit de la composante connexe contenant le centre de la tête de la larve, indiqué en bleu sur la Figure 9F)). En utilisant l'axe principal de la larve précédemment calculé (en rouge sur la Figure 9F), on applique une rotation sur cette composante connexe de manière à ce que l'axe principal de la larve soit parallèle à l'axe des ordonnées et que sa tête soit en haut de l'image. Une série de points décrivant le contour de cette composante connexe est alors extraite (en blanc sur la Figure 10A) en utilisant l'algorithme de Suzuki et al. 1985 (Suzuki 1985). Parmi tous ces points, nous allons identifier trois points en particulier : le point correspondant à l'extrémité de la queue, et deux autres points correspondant à la base de la queue. Pour cela, nous commençons par identifier un des deux points correspondant à la base de la queue en trouvant le point du contour qui est le plus près du centre de la tête (en bleu sur la Figure 10A). En prenant le point symétrique au point que l'on vient juste de trouver par le centre de la tête, et en trouvant le point du contour le plus près de celui-ci, on identifie ainsi la deuxième base de la queue (en noir sur la Figure 10A).

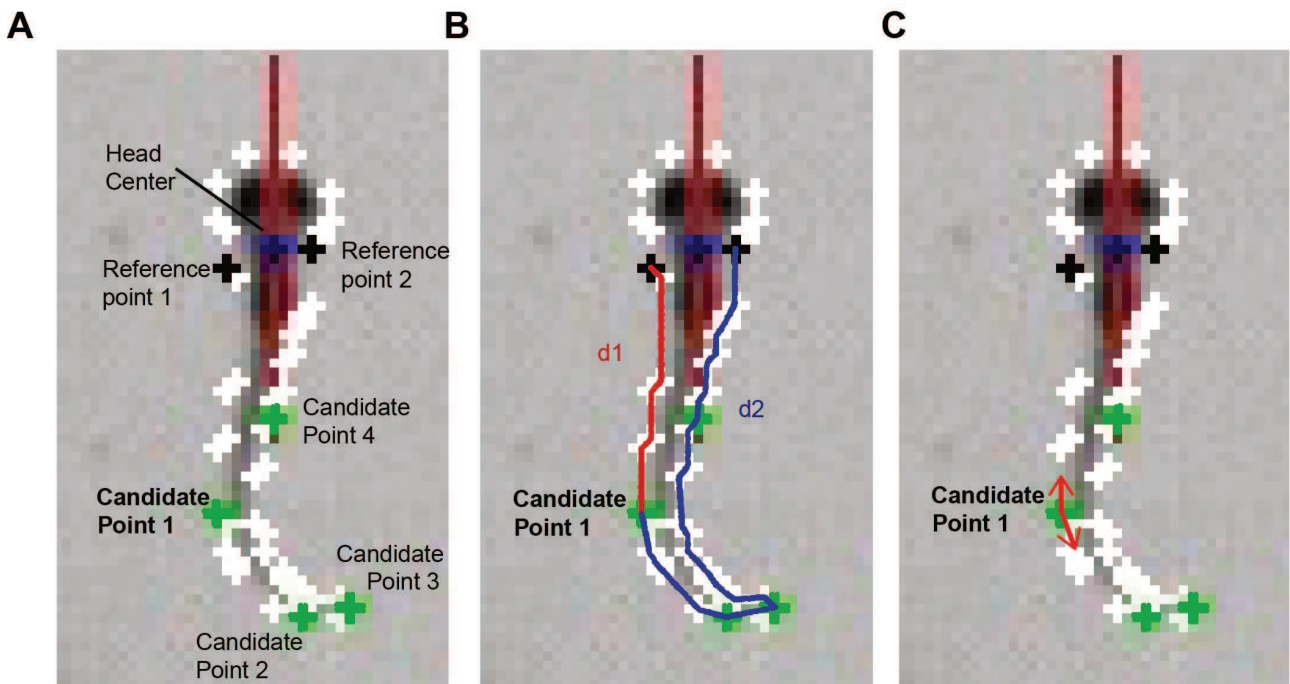


Figure 10: Identification de l'extrémité de la queue. A. Les quatre points candidats correspondent aux quatre points du contour (en blanc) ayant respectivement la plus petite valeur de x , la plus petite valeur de y , la plus grande valeur de x , la plus grande valeur de y . B. Les deux distances $d1$ et $d2$ pour le point candidat 1. C. Les vecteurs utilisés pour identifier le point candidat avec la plus petite valeur de produit scalaire pour le point candidat 1.

Nous devons maintenant identifier l'extrémité de la queue. Pour cela, quatre points « candidats » sont identifiés parmi la série de points décrivant le contour : le point ayant la plus petite abscisse, le point ayant la plus grande abscisse, le point ayant la plus petite ordonnée, et enfin le point ayant la plus grande ordonnée (croix vertes sur la Figure 10A). Pour le point candidat avec la plus grande ordonnée, on veille également à ce que celui-ci soit suffisamment éloigné des deux bases de la queue (seuil de 20 % maximum pour le ratio $|d1-d2| / (d1+d2)$, voir Figure 10 et explication ci-dessous). Pour identifier l'extrémité de la queue, on calcule deux distances calculées le long de la queue: la distance $d1$ entre le point candidat et la première base de la queue, et la distance $d2$ entre le point candidat et la deuxième base de la queue (Figure 10B). Les points candidats ayant un ratio $|d1-d2|/(d1+d2)$ au-dessus de 0.25 sont exclus du groupe des points candidats. Ceci permet de supprimer les points candidats qui seraient anormalement près d'une des bases de la queue. Pour les points candidats restants, on calcule alors le

produit scalaire de deux vecteurs tangents aux contours, qui pointent dans des directions opposées, et qui ont pour base le point candidat (Figure 10C). Le point candidat ayant le produit scalaire le plus petit est identifié comme l'extrémité de la queue.

Enfin l'algorithme ré-échantillonne deux ensembles de points : l'ensemble des points compris entre l'extrémité de la queue et la première base de la queue, et l'ensemble des points compris entre l'extrémité de la queue et la deuxième base de la queue. Cet échantillonnage est fait de telle sorte que chaque segment contienne le même nombre de points. On peut donc calculer pour chacun des deux points qui se correspondent sur chacun des deux segments, le centre de ses deux points. Ce qui permet donc finalement d'obtenir la ligne centrale de la queue (Figure 7).

3- Gestion des contacts entre larves lors de l'algorithme de tracking

Nous venons de décrire comment le programme que nous avons développé, ZebraZoom, suit la position de la tête et de la queue des animaux sur l'ensemble d'une vidéo. Néanmoins, il y a certains cas particuliers pour lesquelles cet algorithme simple ne fonctionne plus : lorsque plusieurs larves se touchent. Nous avons mis en place un algorithme spécifique qui apporte une solution dans ces situations. Lors de contacts, l'algorithme est mis en défaut de deux manières différentes : pendant le tracking de la tête des animaux, et pendant le tracking de la queue des animaux.

En ce qui concerne le tracking de la tête des animaux, si il y a un contact entre des têtes de larves de poisson zèbre, il est possible qu'une seule composante connexe apparaisse au lieu de deux. Dans ce cas, pendant le processus de lien, au moment où l'on calcule $j_i = \operatorname{argmin}_{k \in [1;V]} (\|Y_i^{T+1} - o_k^{T+1}\|)$ on trouve alors le même j pour deux valeurs différentes de i (notons les i_1 et i_2).

Notre algorithme modifié va alors se focaliser sur la zone autour de la composante connexe j et va réappliquer un filtre d'érosion autant de fois que nécessaire jusqu'à ce que la composante connexe se divise en deux

composantes connexes ou plus. On calcule les distances entre Y_{i1} et Y_{i2} et les centres des composantes connexes trouvées. En trouvant les distances minimales, on en déduit alors les liens entre l'image courante et les images précédentes pour les larves $i1$ et $i2$.

En ce qui concerne le tracking de la queue des animaux, si les queues de larves différentes rentrent en contact, l'algorithme initial ne fonctionne pas car les composantes connexes détectées, représentant normalement une seule larve, en représentent ici plusieurs. Lorsqu'une composante connexe (Figure 9D) est supérieure à un seuil (1.9 mm^2), le programme détecte qu'il y a une collision et va diviser cette composante connexe représentant deux larves en deux composantes connexes représentant les deux animaux.

Suivant la distance entre les deux têtes des deux larves concernées, deux algorithmes distincts vont être appliqués. Si cette distance est inférieure à 1.32 mm , un algorithme de « séparation par segment » sera appliqué ; tandis que si cette distance est supérieure à 1.32 mm , un algorithme de « séparation par diminution de la valeur de seuillage » sera appliquée.

L'algorithme de « séparation par segment » consiste à tracer un segment pour séparer la composante connexe en deux composantes connexes. La longueur de ce segment est fixée arbitrairement initialement. Le centre de ce segment est créé en prenant comme base le centre des deux têtes des deux larves. Enfin, l'angle du segment est choisi de manière à maximiser la somme des aires des deux plus grandes composantes connexes résultant de la division par le segment. Pour être considérées dans cette addition, les composantes connexes doivent contenir le centre d'une des deux têtes.

L'algorithme de « séparation par diminution de la valeur du seuillage » consiste à augmenter progressivement la valeur du seuil lors de l'étape de binarisation, jusqu'à ce que deux composantes connexes contenant toutes deux le centre d'une tête émergent.

Dans les deux cas, ces algorithmes permettent de diviser une composante connexe en deux afin de faire apparaître les composantes connexes qui représentent les silhouettes des deux larves.

Dans une dernière étape, l'algorithme vérifie que la longueur des queues

de larves trouvées est raisonnable, c'est-à-dire comprise entre 1.32 et 3.96 mm. Si ce n'est pas le cas, la position de la queue de l'image courante est ramenée à la position de la queue de l'image précédente. En revanche, l'axe principal de la queue et le centre de la tête restent inchangés.

C-Détection de mouvements

1-Algorithmme de détection de mouvements

Typiquement, les larves de poisson zèbre réalisent des mouvements de quelques centaines de millisecondes séparés par des périodes de repos de quelques secondes. Les mouvements de ces animaux sont ainsi organisés en « bouffées natatoire ». Une première étape nécessaire avant de réaliser une analyse du comportement est donc de détecter ces mouvements. Pour cela, ZebraZoom va se baser sur l'angle de la queue (Figure 11A). Celui-ci correspond à l'angle entre l'axe principal de la tête et l'axe formé par le centre de la tête et l'extrémité de la queue (Figure 11A). Pour chaque larve de poisson zèbre, un filtre médian est appliqué pour corriger les irrégularités de cet angle (Figure 11B). ZebraZoom calcule ensuite à chaque instant la valeur absolue de la différence entre la valeur de cet angle à un instant donné et une valeur moyenne de cet angle sur 10 images avant et après. Les mouvements sont ensuite détectés lorsque la valeur absolue de cet angle est supérieure à 1.15 degrés.

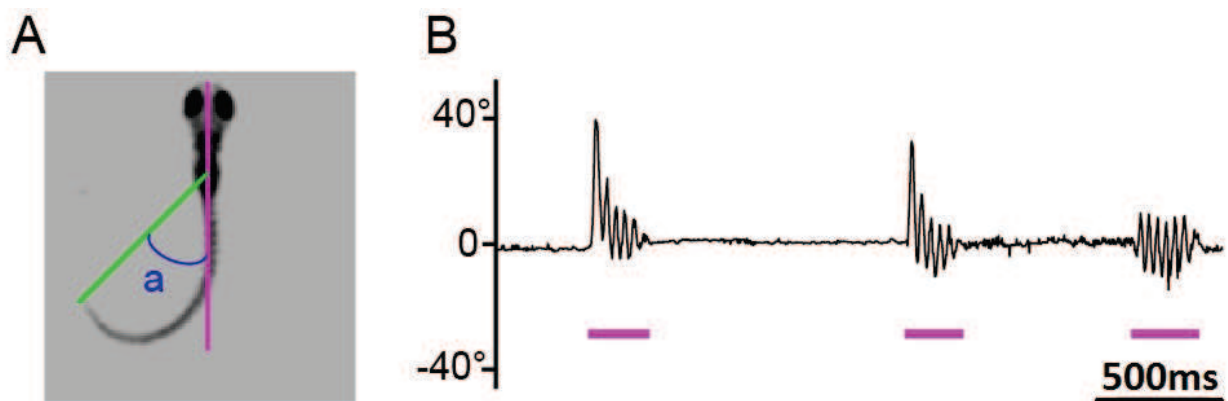


Figure 11: Angle de la queue et détection de mouvements. A. Définition de l'angle de la queue séparant l'axe principale de la tête (rose) et l'axe reliant le centre de la tête à l'extrémité de la queue (vert). B. Exemple de l'évolution de l'angle de la queue au cours du temps. Les détections automatiques de mouvements par ZebraZoom sont indiquées par une barre rose horizontale.

Afin d'éviter de séparer un mouvement en plusieurs mouvements au moment de la détection d'un mouvement à partir de l'angle, les mouvements détectés et étant réalisés dans une fenêtre inférieure à 14.8 ms sont regroupés en un mouvement unique.

De plus, afin d'éviter des « faux positifs », ZebraZoom réalise plusieurs tests sur les mouvements détectés afin de vérifier qu'il s'agit de mouvements réels. ZebraZoom vérifie pour chaque mouvement que (1) le centre de la tête de la larve concernée a bougé d'une distance supérieure à 0.099 mm, que (2) l'angle de la queue a bougé d'une amplitude supérieure à 2.86 degree, et que (3) l'image brute de la vidéo dans cette zone a été effectivement modifiée pendant le mouvement de la larve.

Cette section de ZebraZoom sur la détection de mouvements, ainsi que les parties suivantes sur l'analyse du comportement, ont été écrites en MATLAB (<http://www.mathworks.fr/>).

2-Validation de la détection de mouvements lors du tracking

Afin d'évaluer l'efficacité de cette première section concernant le tracking et la détection de mouvements, nous avons réalisé quelques tests sur des exemples concrets de vidéos. Un expérimentateur manuel a analysé trois vidéos distinctes sur lesquelles ZebraZoom avait réalisé le suivi des larves. Sur des extraits de chacune de ces trois vidéos, il a manuellement identifié chaque moment où les larves bougeaient. Un fichier a permis de répertorier 189 mouvements pour lesquels chaque ligne représente un mouvement et contient le numéro de la larve qui a bougé et la première et dernière image du mouvement. Nous avons automatiquement comparé les mouvements détectés par l'expérimentateur manuellement et les mouvements détectés par le programme de détection de mouvements de ZebraZoom. Les faux négatifs sont des mouvements détectés par l'expérimentateur manuellement mais pas par ZebraZoom (« faux négatifs », c'est-à-dire mouvements manqués par l'algorithme), et les faux positifs sont les mouvements détectés par ZebraZoom mais pas par l'expérimentateur manuellement (« faux positifs », c'est-à-dire

mouvements non réels). Sur 189 mouvements, nous avons trouvé un taux de faux négatifs de 2.7 % (5 sur 189 total) et un taux de faux positifs de 3.7 % (7 sur 189 total).

A partir des séquences de quatre vidéos différentes, représentant un total de 720 secondes, un expérimentateur a manuellement estimé la fréquence d'erreur sur l'identité (le numéro) d'une larve, ce qui arrive en général lors d'un contact entre deux larves. Ces inversions d'identité entre larves arrivent en moyenne toutes les 109 secondes (0.0092 ± 0.0036 Hz (ste) inversion par seconde par larve).

Les seuils cités précédemment pour le suivi (tracking) et pour la détection de mouvements ont été fixés de façon empirique. Néanmoins ils pourraient facilement être modifiés pour s'adapter à d'autres conditions expérimentales. Ainsi, il serait par exemple possible d'adapter le système de tracking à un suivi de poisson zèbre adulte, à condition que les mouvements observés aient lieu en 2D.

IV-ZebraZoom : Quantification globale du comportement

Nous allons maintenant décrire l'analyse du comportement qui est réalisée de deux façons différentes par ZebraZoom. Dans cette partie nous nous intéresserons à la quantification du comportement par des paramètres cinématique globaux.

A-Quantification du comportement par des paramètres globaux

1-Extraction de paramètres globaux

Pour chaque mouvement préalablement détecté (explication dans la partie précédente), ZebraZoom calcule des paramètres représentant globalement la dynamique du mouvement en question. Ainsi, le premier paramètre le plus simple à calculer est la durée du mouvement : pour calculer celle-ci, il suffit de soustraire le temps de fin du mouvement au temps de début du mouvement. La distance parcourue au cours du mouvement est calculée en s'intéressant aux positions de la tête de la larve toutes les 24 ms. ZebraZoom calcule la distance parcourue entre chacune des positions intermédiaires, additionne entre elles l'ensemble de celles-ci, et trouve ainsi la distance totale parcourue par le poisson. La vitesse moyenne du mouvement est ensuite calculée simplement en divisant la distance parcourue par le temps de parcours. L'amplitude de l'angle de l'axe principal de la tête est quant à elle calculée en s'intéressant à l'ensemble des angles pris par l'axe principal de la tête et en soustrayant le maximum de cet ensemble au minimum de cet ensemble. ZebraZoom s'intéresse ensuite à l'évolution de l'angle de la queue au cours du mouvement : le logiciel va notamment détecter les maximums et les minimums locaux de cet angle au cours du temps. En se basant sur ces derniers, ZebraZoom va calculer deux autres paramètres : le nombre d'oscillations de la queue, et la fréquence moyenne de battement de la queue.

ZebraZoom fournit également le nombre total de mouvements, la distance totale parcourue et la durée totale de nage pour une population.

2-Analyses par paramètres globaux

Afin de comparer la locomotion de populations distinctes de larves, ZebraZoom établit les distributions, les valeurs moyennes, et erreurs standard de chacun des paramètres cinétiques globaux « par larve » (et non par mouvement).

Afin de mieux connaître la nage spontanée de la larve de poisson zèbre entre cinq et sept jours après fertilisation, nous avons mesuré ces différents paramètres globaux sur un nombre important de mouvements obtenus à partir de 448 larves différentes, 6 portées différentes filmées sur un total de 8 vidéos (contenant chacune 8 boîtes de pétris), des larves âgées de 5 à 7 jours, qui ont produit un total de 44688 mouvements. En estimant les valeurs moyennes et les erreurs standard de ces paramètres cinétiques globaux, nous avons observé que pour des larves de 5 à 7 jours, les mouvements avaient lieu toutes les 2.22 s en moyenne par larve (0.4495 ± 0.0117 Hz) (Figure 12). Pour tous les mouvements identifiés, les larves réalisent en moyenne 3.19 ± 0.01 oscillations par mouvement, ont une fréquence de battements de la queue de 24.29 ± 0.03 Hz, durent 189.5 ± 0.0004 ms avec $51.14 \pm 0.18^\circ$ de gamme d'angles de l'axe principale de la tête, 2.49 ± 0.008 mm de distance parcourues et 13.35 ± 0.04 mm/s de vitesse moyenne par manœuvre (Figure 12).

	Mean	Ste
Nb. Osc	3.19	0.01
Mean TBF (Hz)	24.29	0.03
Duration (ms)	189.5	0.0004
Heading (°)	51.14	0.18
Distance (mm)	2.49	0.01
Speed (mm/s)	13.35	0.04
Number of Mouvements	0.45	0.01

Table 3: Valeur moyenne et erreur standard des paramètres globaux pour 44 688 mouvements de poissons Wild Type. Paramètres de haut en bas: Nombre d'oscillations, Fréquence moyenne des battements de la queue, Durée du mouvement, Ouverture d'angle pris l'axe principal de la tête, Distance parcourue, Vitesse Moyenne, Nombre total de mouvements réalisés par les larves de poissons zèbre.

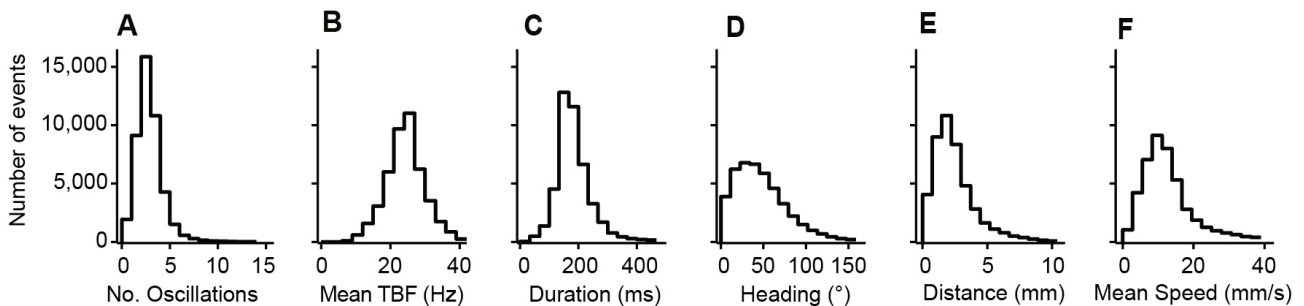


Figure 12: Distribution de paramètres globaux décrivant la locomotion de larves de poissons zèbres de 5 à 7 jours. A. Nombre d'oscillations. B. Moyenne de la fréquence de battements de la queue. C. Durée du mouvement. D. Angle de l'axe principal. E. Distance parcourue. F. Vitesse Moyenne

Cette approche initiale permet d'analyser sur des larves l'effet d'une drogue en comparant la locomotion de larves soumises à la drogue à celle des larves contrôles, non droguées. Le but de cette approche initiale est de donner une première vision globale du comportement.

En utilisant le test statistique de Kolmogorov-Smirnov, nous avons constaté qu'aucune de ces distributions n'était gaussienne. Pour tous les tests statistiques entre plusieurs populations de poissons (tels que celles dont nous parlerons dans la suite), nous utilisons donc un test de « Wilcoxon rank sum » qui ne suppose pas que les distributions soient normales.

B-Exemple de quantification du comportement avec des paramètres globaux

Nous allons maintenant montrer des exemples concrets d'application de cette méthode de quantification globale des paramètres cinétiques globaux du mouvement.

1-Réseaux neuronaux impliqués dans la locomotion

La larve de poisson zèbre peut se déplacer grâce aux battements de sa queue. Ces derniers sont contrôlés par les CPGs ("Central pattern generators"), des réseaux neuronaux distribués le long de la moelle épinière de la larve, et capable de générer des sorties rythmiques de façon autonome, sans retour sensoriel ou commandes descendantes (Grillner and Wallen 1985). Ces CPGs activent des motoneurones qui à leur tour, sont responsables de la contraction des muscles.

L'activité des CPGs est souvent déclenchée par des voies descendantes provenant du cerveau, mais est également sous l'influence d'afférents sensoriels. Ces afférences peuvent agir sur les CPGs par l'intermédiaire des voies descendantes: c'est le cas par exemple de la vue ou de l'ouïe, et des réponses de fuites déclenchées par des stimulations mécanique qui impliquent les cellules de Mauthner (Kimmel, Eaton, and Powell 1980). Néanmoins, il a été montré chez d'autres modèles animaux tel que le chat que des neurones sensoriels peuvent moduler localement les CPGs de la moelle épinière (Rossignol 2006).

Les voies descendantes étudiées sont principalement glutaminergiques (Grillner and Jessell 2009). Néanmoins, des transmissions glycinergiques ont également été observé en particulier chez le poisson zèbre adulte (Barreiro-Iglesias et al. 2013).

Dans les CPGs, les entrées synaptiques glutaminergique permettent de déclencher les activités rythmiques et l'activation des motoneurones responsable de la contraction des muscles (Grillner and Jessell 2009). Mais il existe également des interneurones commissuraux glycinergique permettant l'inhibition réciproque entre les deux côtés de la moelle. Lorsque les

interneurones et motoneurones situés d'un côté de la moelle (droit ou gauche) sont actifs, et donc que les muscles de ce côté de l'animal sont contractés, l'inhibition réciproque entre interneurones commissuraux permet d'inhiber les motoneurones du côté contralateral et ainsi d'empêcher la contraction des muscles du côté opposé. Sans ce processus d'inhibition réciproque, l'alternance des battements de queue successifs de gauche à droite de la larve de poisson zèbre serait impossible, et l'animal ne pourrait pas se mouvoir (Dale 1985; Drapeau et al. 2002; Grillner et al. 1995; Li 2004). Confirmant cette hypothèse de travail, plusieurs études ont montré que des animaux mutants pour le gène d'un récepteur à la glycine ou du transporteur de glycine présentaient des défauts de génération de mouvements (Odenthal et al. 1996; Hirata et al. 2005; Masino 2005; Granato et al. 1996).

2-Le rôle de la glycine dans la locomotion

La majorité de notre compréhension du rôle de la glycine dans l'inhibition réciproque provient d'expériences d'électrophysiologie sur des animaux paralysés afin de pouvoir enregistrer l'activité des motoneurones grâce à des techniques d'électrophysiologie. Afin de confirmer ces résultats sur des animaux libres de se mouvoir, nous avons testé l'effet de la strychnine (75 μ M), un antagoniste du récepteur de la glycine sur la locomotion libre de larves de poisson zèbre.

Nous avons enregistré deux populations de larves, des larves non droguées, et des larves sur lesquelles nous avons appliqué la strychnine, qui bloque le récepteur de la glycine. Sur les huit boîtes de pétri observée pendant un enregistrement, nous avons utilisé les larves présentes dans quatre boîtes pour tester l'effet de la drogue dans le bain, et les quatre autres ont servi de témoins (sans drogues appliquées sur celles-ci). Deux enregistrements ont été effectués : une vidéo avant l'application de la drogue, et une vidéo après l'application de la drogue. Les expériences ont été réalisées sur des larves de six et sept jours, provenant de deux portées différentes et exposées à la drogue dans le bain. Pour les larves contrôles, nous n'avons pas observé de

changements significatifs dans la fréquence des mouvements (0.35 +/- 0.05 mouvements par larve et par secondes avant application de la drogue et 0.27 +/- 0.03 mouvements par larve et par seconde après) ou sur les autres paramètres globaux ($p > 0.15$) (Figure 13, Figure 22). En revanche, la locomotion des larves sur lesquelles la strychnine a été appliquée a été significativement impactée : la fréquence d'occurrences des mouvements a significativement diminué (0.30 +/- 0.04 Hz avant et 0.12 +/- 0.02 Hz après, $p < 0.0002$), ainsi que le nombre d'oscillations (3.52 +/- 0.17 avant et 2.89 +/- 0.16 après ; $p < 0.0078$), la durée de mouvements, la distance parcourue, la vitesse moyenne et la gamme d'angles pris par l'axe principale de la tête ($p < 0.0001$). La fréquence moyenne de battement de la queue n'a en revanche pas été impactée ($p > 0.81$) (Figure 13, Figure 22). Comme expliqué précédemment, un test de « Wilcoxon rank sum » a été utilisé pour obtenir les p-valeurs.

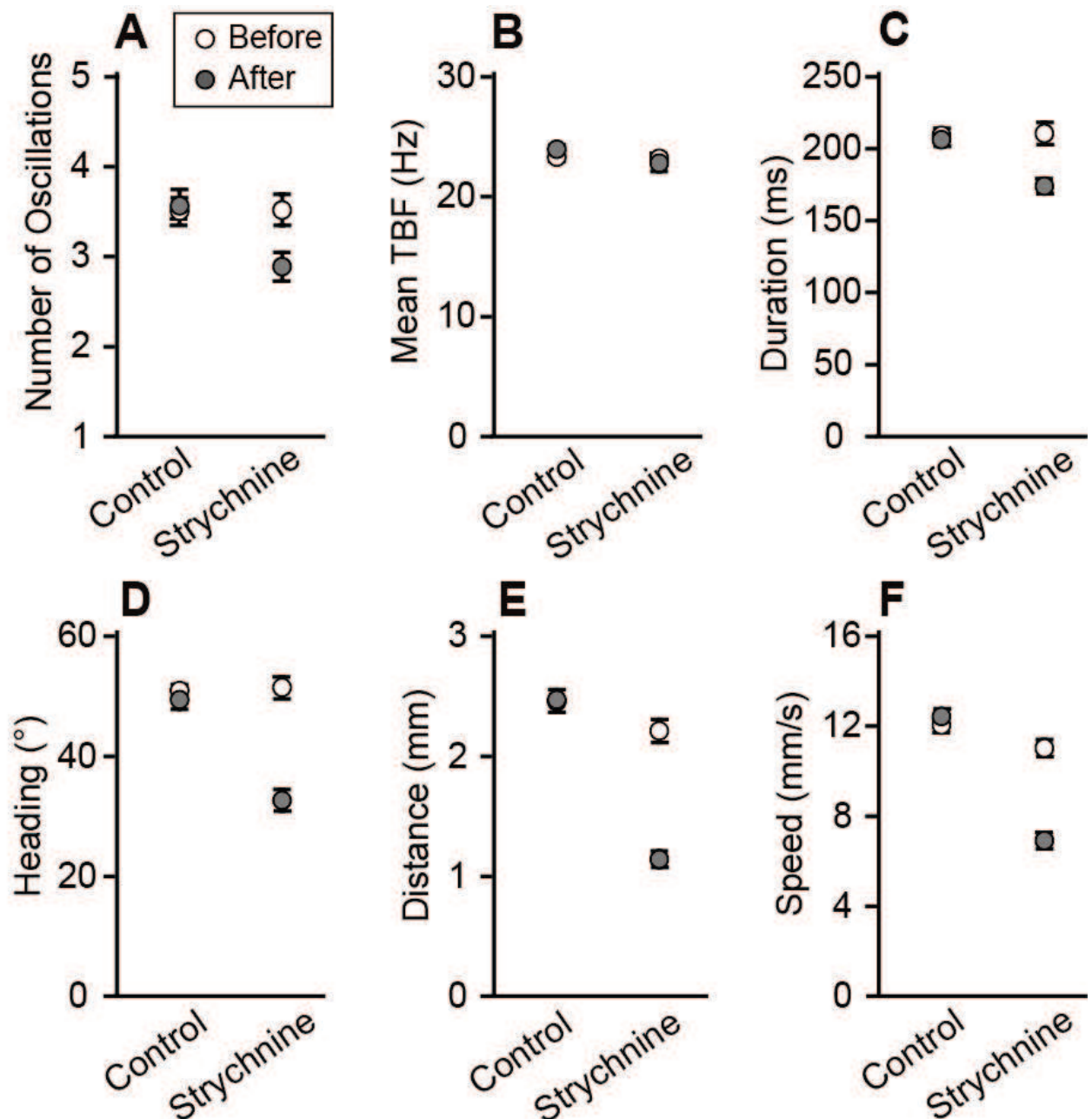


Figure 13: Effet de la strychnine sur les paramètres globaux décrivant le mouvement. Les cercles blancs correspondent aux valeurs avant l'application de la drogue, les cercles noirs aux valeurs après l'application. A. Nombre d'oscillations. B. Moyenne de la fréquence de battements de la queue. C. Durée du mouvement. D. Angle de l'axe principal. E. Distance parcourue. F. Vitesse Moyenne

Les moyennes, variations standard et tests statistiques sont annotés dans les tableaux ci-dessous (Table 4 Table 5).

	Ctrl Avant		Stry Avant		Ctrl Après		Stry Après	
	Mean	Ste	Mean	Ste	Mean	Ste	Mean	Ste
Nb. Osc.	3,51	0,14	3,52	0,17	3,52	0,17	2,89	0,16
Mean TBF (Hz)	23,3	0,35	23,95	0,33	23,19	0,42	22,78	0,69
Duration (secondes)	0,21	0,01	0,21	0,005	0,21	0,01	0,17	0,01
Heading (degrees)	50,94	1,03	49,44	1,6	51,47	1,75	32,64	1,8
Distance (mm)	2,45	0,09	2,47	0,08	2,21	0,1	1,14	0,07
Speed (mm/s)	12,05	0,32	12,43	0,34	11,03	0,38	6,92	0,37
Freq. Mouv. (Hz)	0,35	0,04	0,3	0,04	0,27	0,03	0,12	0,02

Table 4: Valeurs Moyennes et Erreur Standard des Paramètres Globaux dans les différentes conditions de l'expérience sur la strychnine. Ctrl: larves contrôle; Stry: larves sur lesquelles la strychnine est appliquée; Avant: Avant addition de strychnine; Après: Après addition de strychnine. Paramètres de haut en bas: Nombre d'oscillations, Fréquence moyenne des battements de la queue, Durée du mouvement, Gamme d'angles pris par l'axe principal de la tête, Distance parcourue, Vitesse Moyenne, Fréquence des mouvements réalisés par les larves de poissons zèbre.

	Ctrl Avant / Stry Avant	Ctrl Après / Stry Après	Ctrl Avant / Ctrl Après	Stry Avant / Stry Après
Nb. Osc.	0,86	0,001	0,75	0,01
Mean TBF	0,93	0,28	0,17	0,81
Duration	0,84	0,0001	0,82	0,001
Heading	0,77	< 0,0001	0,15	< 0,0001
Distance	0,06	< 0,0001	0,8	< 0,0001
Speed	0,02	< 0,0001	0,46	< 0,0001
Freq. Mouv.	0,16	0,0002	0,42	0,0002

Table 5: P-valeur pour les comparaisons entre les différentes conditions. Avant: Avant addition de strychnine; Après: Après addition de strychnine. Paramètres de haut en bas: Nombre d'oscillations, Fréquence moyenne des battements de la queue, Durée du mouvement, Gamme d'angles de l'axe principal de la tête, Distance parcourue, Vitesse Moyenne, Fréquence de mouvements réalisés par larves de poissons zèbre.

Nous observons que le nombre d'oscillations par mouvement diminue après l'application dans le bain de 75uM de strychnine, résultat attendu mais qui ne pouvait pas être observé avec les logiciels commerciaux pour la larve de poisson zèbre. Par ailleurs cette expérience démontre également un effet de l'antagoniste des récepteurs glycinergiques sur d'autres paramètres de la locomotion tels que les diminutions de la durée du mouvement, de la distance parcourue, de la vitesse moyenne, et de la gamme d'angles de l'axe principal de la tête (Figure 13, Figure 22).

3-Le rôle de la vision dans la locomotion

La vision joue un rôle important chez les êtres vivants, notamment dans leur locomotion en quête de nourriture. A notre connaissance, il n'y a pas eu de comparaison quantitative de la locomotion spontanée d'individus aveugles versus contrôles. Nous avons décidé d'utiliser ZebraZoom pour analyser le comportement de larves de poisson zèbre aveugles via la mutation *atho7 (lak)*, où les animaux sont privés de neurones rétiniens ganglionnaires (Kay et al. 2001). Nos expériences ont été réalisées sur des larves âgées de six jours et provenant de quatre vidéos différentes, quatre portées différentes, et un total de 224 larves filmées. Les huit boîtes de pétri sont suivies en même temps : quatre contenaient chacune sept larves mutantes, et quatre contenaient chacune sept larves sauvages (contrôle de la même portée) (Figure 14 Figure 23). Les valeurs des moyennes, variation standard et tests statistiques sont annotées dans les tables ci-dessous (Table 6 Table 7):

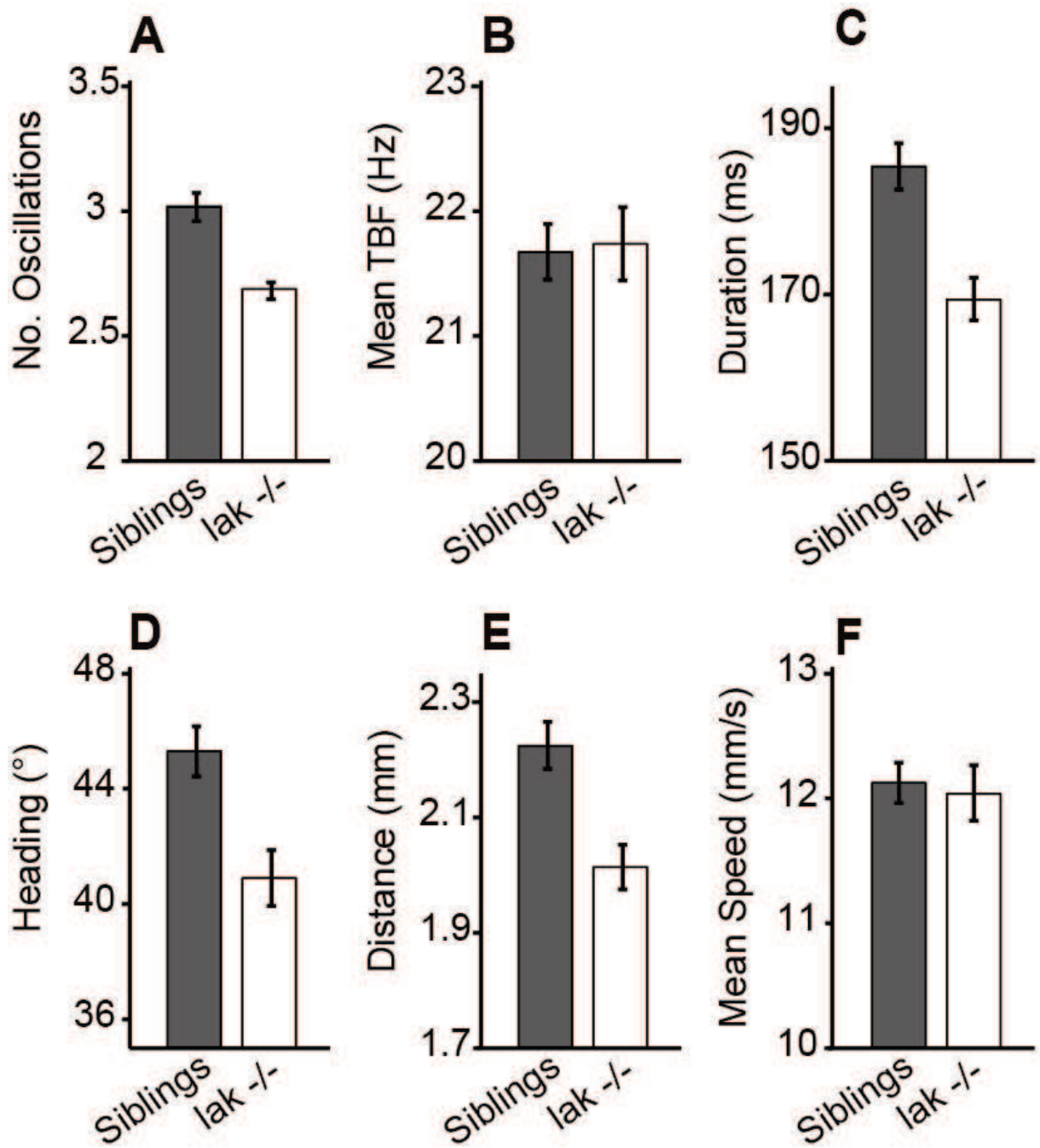


Figure 14: Effet de la mutation *atoh7* (*lak*) sur la locomotion. A. Nombre d'oscillations. B. Moyenne de la fréquence de battements de la queue. C. Durée du mouvement. D. Angle de l'axe principal. E. Distance parcourue. F. Vitesse Moyenne

	Ctrl		Atoh7 -/-	
	Mean	Ste	Mean	Ste
Nb. Osc.	3,01	0,05	2,68	0,03
Mean TBF (Hz)	21,67	0,21	21,74	0,29
Duration (secondes)	0,19	0,0027	0,17	0,0024
Heading (degrees)	45,3	0,86	40,9	0,92
Distance (mm)	2,22	0,04	2,01	0,04
Speed (mm/s)	12,12	0,15	12,04	0,21
Freq. Mouv. (Hz)	0,51	0,02	0,33	0,02

Table 6: Valeurs Moyennes et Erreur Standard des Paramètres Globaux pour les larves contrôle (Ctrl) et mutantes Atoh7 -/- (dites lak). Paramètres de haut en bas: Nombre d'oscillations, Fréquence moyenne des battements de la queue, Durée du mouvement, Gamme des angles pris par l'axe principal de la tête, Distance parcourue, Vitesse Moyenne, Nombre total de mouvements réalisés par les larves de poissons zèbre.

	Ctrl / Lak
Nb. Osc.	< 0,0001
Mean TBF	0.8522
Duration	< 0,0001
Heading	0.0006
Distance	0.0001
Speed	0.7323
Nb. Mouv.	< 0,0001

Table 7: P-valeur pour la comparaison entre les poissons contrôle (Ctrl) et les mutants Atoh7 (lak). Paramètres de haut en bas: Nombre d'oscillations, Fréquence moyenne des battements de la queue, Durée du mouvement, Gamme d'angle pris par l'axe principal de la tête, Distance parcourue, Vitesse Moyenne, Nombre totale de mouvements réalisés par les larves de poissons zèbre.

Nous pouvons donc observer ici une baisse modérée mais statistiquement significative dans la fréquence des mouvements ($p < 0.0001$), le nombre d'oscillations ($p < 0.0001$), la durée ($p < 0.0001$), la gamme d'angles de l'axe principal ($p = 0.0006$), et la distance parcourue ($p < 0.0001$) (Figure 14 Figure 23). Ces différences ont été observées dans chacune des quatre différentes portées. Ces résultats démontrent donc pour la première fois de fines différences entre poissons mutants *atho7* et poissons sauvages. Ces résultats n'auraient pas pu être obtenus avec les logiciels commerciaux.

Dans une publication récente (Norton 2012) il a été observé une tendance vers une diminution de la distance parcourue par les larves aveugles *rx3*^{-/-}. De plus, il a été observé que les larves de poissons zèbre ont tendance à plus se déplacer lorsque l'intensité lumineuse est élevée que lorsqu'elle est faible (Burgess and Granato 2007). Néanmoins, à notre connaissance le motif d'expression du mutant *atoh7* n'a pas été entièrement caractérisé, on ne peut donc exclure l'hypothèse que ce gène soit exprimé dans d'autres structures que la rétine ce qui pourrait donner une explication alternative pour expliquer les défauts moteurs observés. Dans tous les cas, ZebraZoom a permis dans cet exemple de détecter de fines différences de la locomotion entre larves mutantes *atoh7*^{-/-} et contrôles non mutants de la même portée. Seules les différences de distance parcourue et durée pourraient être observées avec les logiciels commerciaux et les autres modifications auraient été difficiles à déceler avec des approches classiques.

V-ZebraZoom : Catégorisation automatique des manœuvres effectuées par les larves de poisson zèbre

L'analyse des paramètres cinétiques globaux a permis de caractériser de manière exhaustive le comportement locomoteur des larves sauvages, et d'obtenir des résultats originaux sur l'effet d'une drogue ou l'analyse fine de mutants. De manière générale, cette approche donne une vision d'ensemble sur le comportement moteur. Néanmoins, la larve de poisson zèbre possède un large registre de comportements stéréotypés qui ne sont pas exploités avec cette approche. Dans ce chapitre, nous verrons comment certaines techniques d'apprentissage automatique ou « machine learning » peuvent permettre de recueillir et d'exploiter cette information sur les comportements stéréotypés afin d'obtenir une analyse plus complète et qualitative du comportement moteur.

A-Méthode de catégorisation automatique des manœuvres

1-Le répertoire de manœuvres de la larve de poisson zèbre

Notre travail se base sur la caractérisation minutieuse menée par Donald M. O'Malley sur la catégorisation manuelle du comportement de larves de poisson zèbre (Budick and O'Malley 2000). Budick et O'Malley ont filmé des larves de poisson zèbre avec des caméras à haute fréquence (typiquement 1000Hz). Les différentes manœuvres réalisées spontanément ou après induction par un stimulus mécanique ont ensuite été caractérisées et identifiées manuellement. Ces dernières sont ensuite représentées par une suite d'images séparées de 2 à 4 ms et représentant le mouvement. Budick et O'Malley les ont caractérisées par plusieurs variables : leur analyse consiste à identifier les moments où les oscillations successives de la queue de l'animal atteignent leur maximum et à caractériser ces derniers en terme d'angle, d'amplitude et de position le long de la queue où la courbure est maximale. Ils ont mesuré les temps entre ces différents maximums, vitesse angulaire, direction de l'angle de la tête, distance parcourue, vitesse de nage et

fréquence de battements de la queue. Différents comportements stéréotypés ont ainsi été identifiés, tels que la nage rectiligne « Slow Forward Swim » (abrégé SFS) pour lequel l'animal nage lentement et en ligne droite, le virage « Routine Turn » (abrégé Turn) pour lequel l'animal tourne sur lui-même puis avance, et la réponse de fuite « Escape Response » (abrégé ER) pour lequel l'animal effectue rapidement un virage à 180° puis s'enfuit à grande vitesse. Dans des conditions naturelles, une réponse de fuite ou « Escape Response » est généralement réalisée après une stimulation sensorielle intense souvent associée à la présence d'un prédateur. Dans nos conditions expérimentales, les réponses de fuite sont souvent associées à des collisions entre larves.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons identifié manuellement ces trois manœuvres caractéristiques. Nous montrons dans la Figure 15 une superposition d'images représentant chacun de ces trois mouvements (le temps entre chaque image superposée est de 17 ms), avec l'angle de la queue au cours du temps et la courbure le long de la queue au cours du temps.

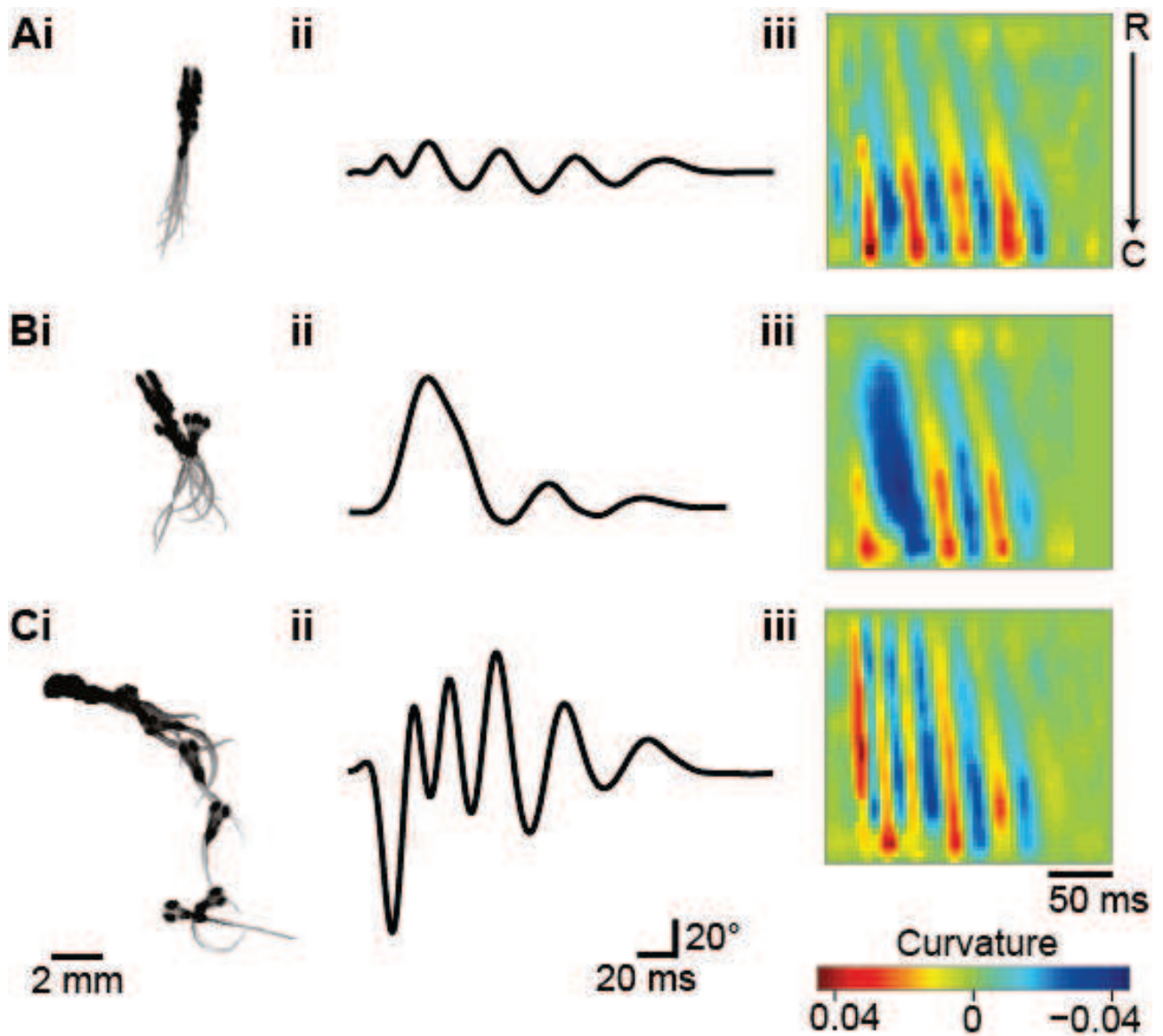


Figure 15: Comportements Stéréotypé de la larve de poissons zèbres. A. Nage rectiligne (SFS). B. Virage (T). C. Réponse de fuite (ER). A1,B1,C1. Images surimposées prises toutes les 17 ms. A2,B2,C2. Angle de la queue au cours du temps. A3,B3,C3. Courbure le long de la queue pour chaque mouvement.

2-Continuum entre comportements

La Figure 15 montre des exemples de manœuvres stéréotypées et ainsi « simples ». Néanmoins de nombreux mouvements sont intermédiaires. Par exemple, certains mouvements sont à la frontière entre des Turns et des Escape Responses (ER), tandis que certaines manœuvres sont à la frontière entre Nage rectiligne (SFS) et les virages (Turns). Intuitivement il semble donc qu'il puisse exister un continuum entre les différentes classes de comportement.

Afin de tester cette hypothèse, quatre expérimentateurs ont manuellement classifié un total de 188 mouvements provenant de trois vidéos différentes. 82% de l'ensemble de ces mouvements ont été manuellement classifiés dans la même catégorie par au moins trois expérimentateurs sur quatre. Cela suggère que les 18 % de mouvements restants sont des manœuvres ambiguës.

Nous avons examiné les 18% de mouvements ambigus, soit 29 mouvements au total. Sur ces 29 mouvements, 24 mouvements (soit 82.8%) sont des mouvements classifiés comme étant des nages rectilignes par deux expérimentateurs, et comme des virages par les deux autres expérimentateurs. Les 5 mouvements restants (soit 17.2%) sont des mouvements classifiés comme étant des virages par deux expérimentateurs, et comme étant des réponses de fuite par les deux autres. Ces différences de répartition s'expliquent par le fait qu'il y a globalement plus de nages rectilignes et de virages qu'il n'y a de réponse de fuite: sur les 188 mouvements classifiés, 46.5% sont des nages rectilignes, 43.9% sont des virages, et 9.6% sont des réponses de fuite (pourcentages moyens des quatre classifications manuelles). Afin d'observer plus en détail ces mouvements ambigus, considérons les 24 mouvements classés comme des nages rectilignes par deux expérimentateurs, et comme des virages par les deux autres expérimentateurs. Comparons cette classe dite « SSTT » à la classe « SSSS » où les 4 expérimentateurs ont unanimement choisi SFS, et à la classe « TTTT » où ils ont choisi Turn. L'ensemble des mouvements classifiés unanimement par

les quatre expérimentateurs correspond à 94 mouvements soit à 50% des 188 mouvements totaux.

Nous avons comparé les paramètres des trois classes de manœuvres correspondant à SSSS, SSTT et TTTT à partir de l'angle de la queue et de la courbure du mouvement. Les angles de la queue pour les classes SSSS, SSTT et TTTT sont représentés sur la Figure 16A1-A3 (à noter que jusqu'à trois mouvements « outliers » ont été manuellement supprimés pour chaque classe. La moyenne de l'angle pour chaque classe est représentée en couleur et reportée sur la Figure 16B, et tous les angles sont superposés en couleur sur la Figure 16C. Pour la courbure, les graphes de courbure de 12 mouvements provenant des classes SSSS, SSTT, et TTTT sont représentés sur la Figure 17 A-C.

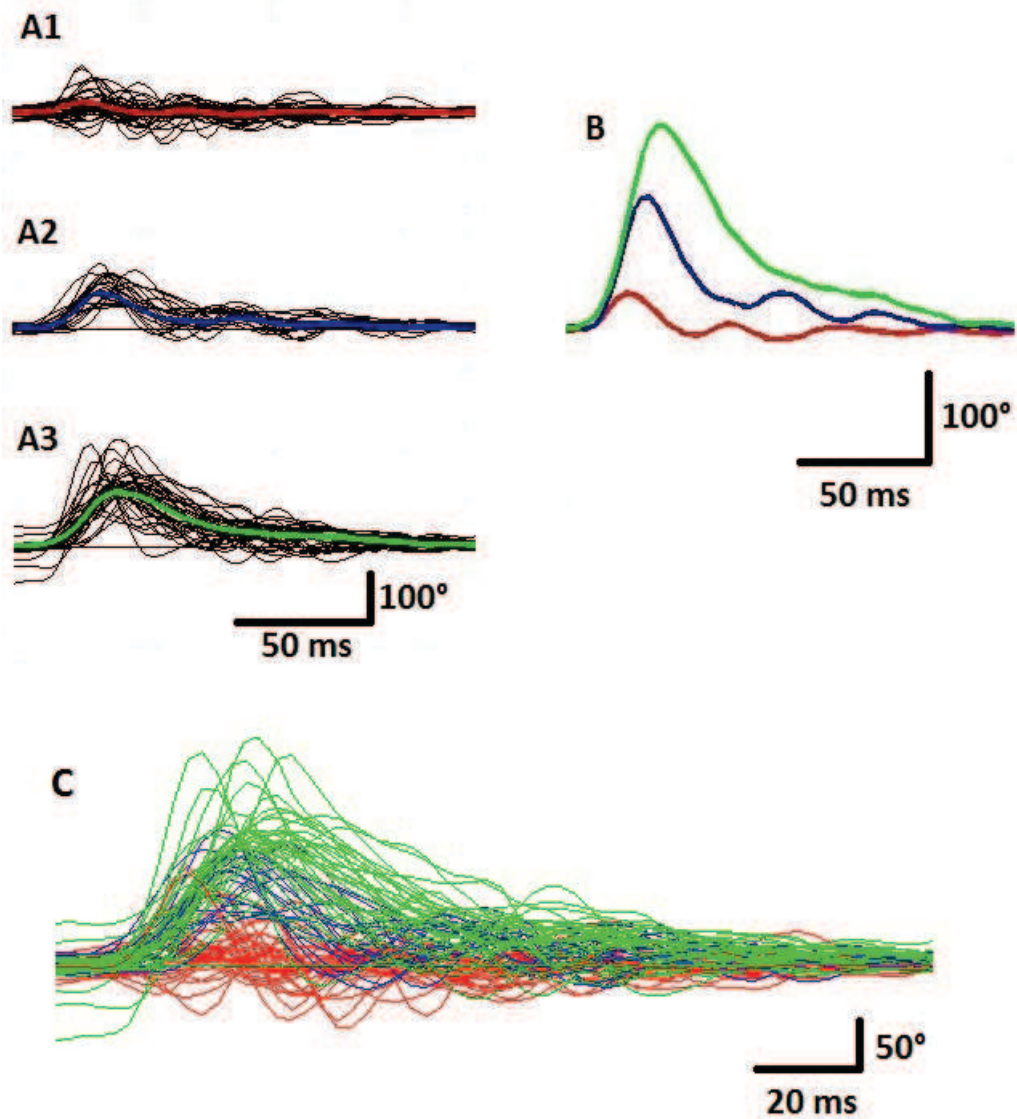


Figure 16: Angle de la queue pour les mouvements SSSS (A1), SSTT (A2) et TTTT (A3). Angle moyen en rouge (SSSS sur A1), en bleu (SSTT sur A2), et en vert (TTTT sur A3) superposés sur B. Angles superposés pour tous les mouvements SSSS (en rouge), SSTT (en bleu) et TTTT (en vert) sur C.

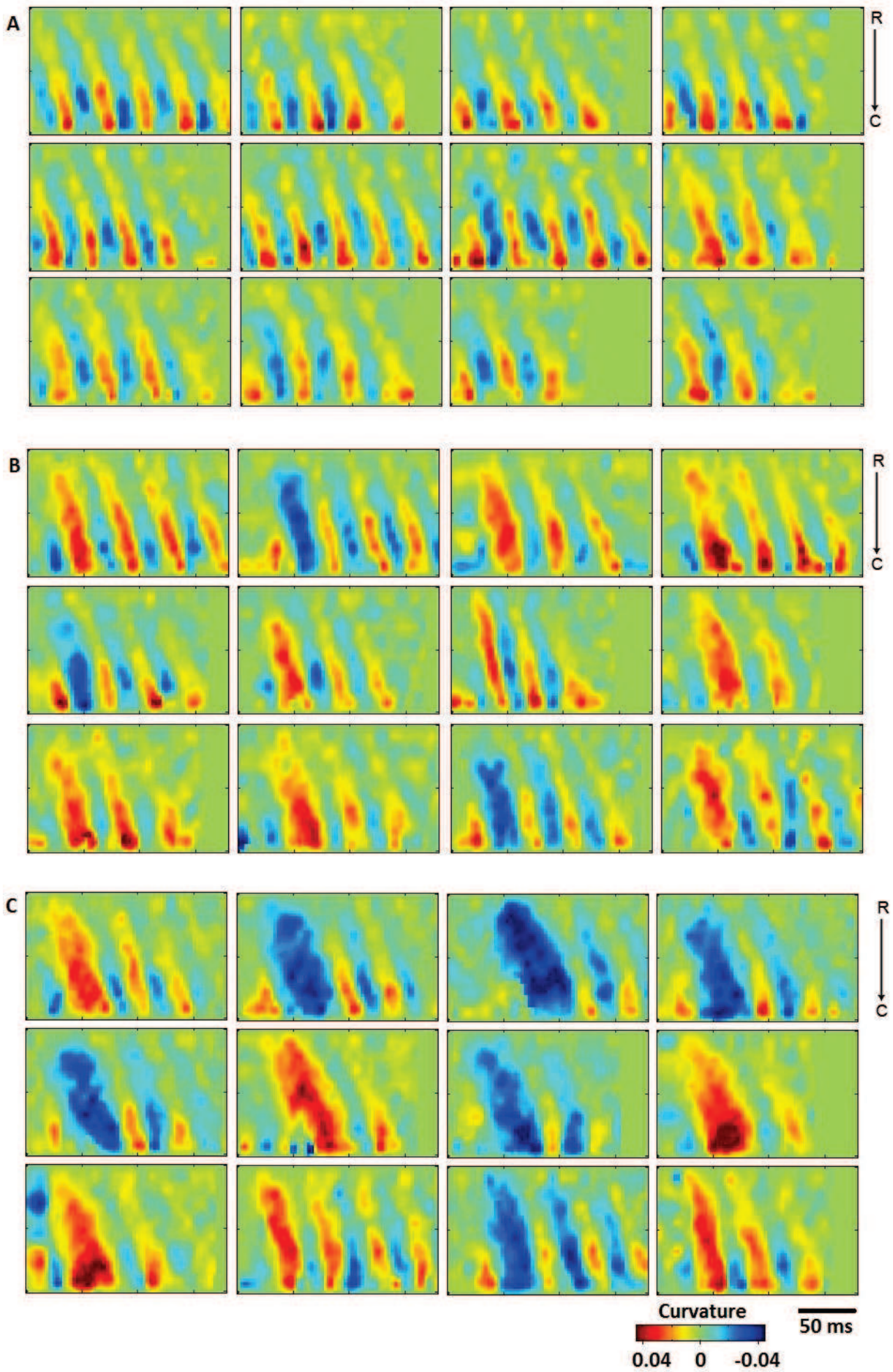


Figure 17: 12 diagrammes de courbure pour les SSSS (A), SS-TT (B), et TTTT (C).

Pour l'angle de la queue comme pour les diagrammes de courbure, on retrouve dans les classes SSSS et TTTT des manœuvres stéréotypées. La classe SSTT contient quant à elle des mouvements intermédiaires se situant entre des nages rectilignes et les virages stéréotypés.

Néanmoins la classe de mouvements SSTT ne pourrait-elle pas correspondre à une nouvelle classe de comportement, indépendante de la classe des nages rectilignes et des virages? La Figure 16C montre que certaines des courbes des différentes classes de mouvements se superposent. Ceci va dans le sens d'ensembles SSSS et SSTT non disjoints ainsi que d'ensembles SSTT et TTTT également non disjoint. La classe SSTT ne serait donc pas une classe de comportement à part, et il y aurait donc bien un continuum entre nages rectilignes et virages.

À noter que loin d'être une démonstration rigoureuse, nous considérons plutôt ces résultats et explications comme une illustration de l'existence très probable d'un continuum entre les comportements de la larve de poisson zèbre. Une démonstration rigoureuse dépasse le cadre de cette thèse.

3-Paramètres dynamiques pour la catégorisation automatique des manœuvres

Malgré cette probable continuité entre type de manœuvres, nous pensons qu'il pourrait certainement être très utile d'obtenir automatiquement, pour chaque mouvement détecté par ZebraZoom, une catégorisation dans l'une des trois classes possibles de comportement : nage rectiligne, virage, ou réponse de fuite.

Notre technique de classification automatique repose sur deux éléments clés : une représentation via des paramètres dynamiques pour chaque mouvement, et une technique de catégorisation. Commençons par le premier élément clé qui est la représentation via des paramètres dynamiques pour chaque mouvement.

Chaque mouvement détecté par ZebraZoom est initialement représenté par la dynamique de l'angle de la queue au cours du temps. Afin de représenter au mieux chaque mouvement, nous avons décidé d'extraire de cet

angle quatre paramètres dynamiques (Figure 18). En cherchant les maximums et minimums locaux de l'angle de la queue, nous extrayons à différents moments du mouvement des mesures d'amplitude de l'angle, de fréquence de l'angle, et de position moyenne de l'angle. Au temps 0, la valeur de chacun de ces paramètres est arbitrairement choisie égale à la première mesure trouvée au cours du temps pour le paramètre en question. En nous intéressant aux positions successives du centre de la tête de la larve au cours du temps, nous calculons aussi la vitesse instantanée à différents moments du mouvement. Nous interpolons ensuite les valeurs de ces quatre groupes grâce à une fonction spline et nous obtenons à intervalles de temps réguliers les valeurs de (1) l'amplitude instantanée de l'angle (0-178 ms, échantillonnée toutes les 12 ms), (2) la fréquence instantanée de l'angle (0- 104 ms, échantillonnée toutes les 7 ms), de la position moyenne de l'angle (0-178 ms, échantillonnée toutes les 12 ms), et de la vitesse instantanée de nage (0-240 ms, échantillonnée toutes les 24 ms) (Figure 18). En prenant l'ensemble de toutes les valeurs interpolées à intervalles de temps réguliers, on obtient un ensemble de 53 valeurs fournissant une représentation dynamique d'un mouvement détecté par ZebraZoom. Nous appliquons ensuite une analyse en composantes principales (PCA), et nous gardons les 14 premières composantes principales obtenues (qui représentent en moyenne 93% de la variance), et nous ajoutons à ces 14 paramètres la durée totale du mouvement. Ce quinzième paramètre compense le fait que nous nous restreignons à une fenêtre de temps lors du calcul des variables instantanées. Nous aboutissons donc au final à 15 paramètres représentant un mouvement détecté par ZebraZoom.

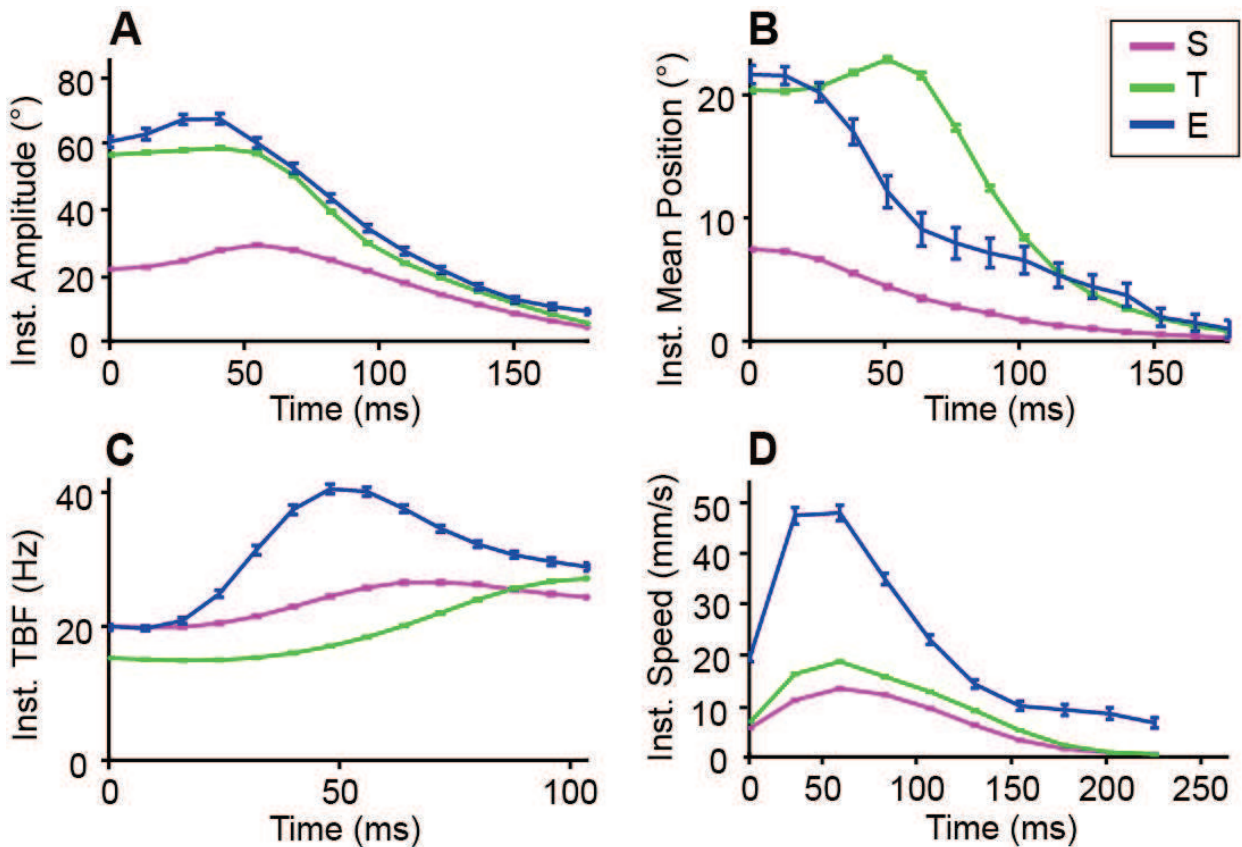


Figure 18: Paramètres dynamiques utilisés pour la catégorisation. A. Amplitude Instantanée. B. Positions Moyennes Instantanées. C. Fréquence instantanée de battement de la queue. E. Vitesse Instantanée

Comme on peut le noter sur la Figure 18, ces paramètres dynamiques varient au cours du temps de façon plus modérée que l'angle de la queue, ce qui les rend moins sensibles aux variations de détection des temps de début et de fin de mouvement ainsi qu'à la variabilité au sein de chaque comportement. Comparé aux paramètres globaux calculés dans le chapitre précédent, qui décrivent les mouvements dans leur globalité (et donc de façon intuitive et facilement interprétable), ces paramètres dynamiques fournissent une quantification à tous les instants des mouvements, et les décrivent donc de façon plus détaillée mais moins intuitive. Ces paramètres dynamiques ne sont pas destinés à être utilisés par les utilisateurs de ZebraZoom mais par un programme de classification automatique, la non-intuitivité n'est pas problématique tandis que la description détaillée est avantageuse pour développer une catégorisation plus performante.

4-Algorithmes de Catégorisation Automatique

Décrivons désormais notre méthode de catégorisation établie à partir des 15 paramètres calculés pour un mouvement donné. Une méthode efficace pour catégoriser le comportement consiste à utiliser des méthodes de classification supervisée, une branche du Machine Learning, pour réaliser ces catégorisations de façon automatique. Ces méthodes reposent sur une première étape d'apprentissage pendant laquelle des mouvements manuellement identifiés et catégorisés par un expérimentateur sont utilisés pour apprendre un modèle. Lors de l'exécution du programme, ce modèle est alors utilisé pour catégoriser automatiquement les mouvements détectés par le programme. Il existe de nombreuses méthodes différentes de classification supervisée, et il reste donc à déterminer laquelle utiliser.

Dans Ctrax, le logiciel créé par Branson pour catégoriser automatiquement le comportement des drosophiles en 2D (Branson et al. 2009), les données utilisées pour l'apprentissage sont utilisées pour trouver de façon automatique des seuils qui vont permettre la catégorisation (en s'appliquant sur les paramètres représentant les mouvements). Comme précisé par Branson, un avantage majeur de cette technique réside dans le fait qu'après apprentissage, les seuils peuvent être manuellement inspectés par des experts du comportement animal et éventuellement ajustés ou rectifiés si nécessaire. Si cette méthode est intuitive, des méthodes alternatives permettent néanmoins d'obtenir de meilleurs résultats en termes de performance de classification. Kotsiantis et collaborateurs ont passé en revue les principales méthodes de classification supervisée : les arbres de décision, les réseaux neuronaux, les classifieurs bayésiens, les k plus proche voisins et les SVMs (Kotsiantis, Zaharakis, and Pintelas 2007). Ces diverses méthodes sont comparées par divers critères : performance de classification en général, rapidité de classification, rapidité d'apprentissage, tolérance au bruit, aux attributs redondants, etc... ZebraZoom est destiné avant tout à être utilisé en post-traitement, avec pour objectif principal d'atteindre un taux élevé de bonnes classifications. Kotsianstis et collaborateurs suggèrent que ce sont les

SVMs (Cristianini, N., and Shawe-Taylor, J. 2000) qui fournissent en général les plus forts taux de catégorisation, mais que le taux de bonnes classifications des différentes méthodes est très dépendant des données à traiter et que l'idéal est en général de comparer différentes méthodes entre elles pour chaque cas particulier.

Pour ZebraZoom, nous avons testé les arbres de décision, les classifieurs bayesiens, et les SVMs. Pour comparer les taux de classification de ces différentes méthodes, nous avons utilisé l'approche présentée dans la partie suivante (V-A-5) en utilisant les classifications de l'expérimentateur manuel entraîné. Nous avons trouvé des taux de classification correcte de: 82.0% pour les arbres de décision, 75.4% pour le classifieur bayésien, et 82.5% pour le SVM avec noyau linéaire. Nous avons donc choisi d'utiliser un SVM avec noyau linéaire pour ZebraZoom.

La procédure d'apprentissage de ce SVM est réalisée grâce à un ensemble de cinq vidéos sur lesquelles des mouvements ont été manuellement identifiés et catégorisés par un expérimentateur entraîné (201 mouvements au total). Étant donné qu'il y a trois différents types de comportements à détecter et qu'un SVM réalise une classification binaire, ZebraZoom utilise un premier SVM pour différencier les nages rectilignes des virages et des réponses de fuite, puis si nécessaire, un second SVM pour différencier virages des réponses de fuite.

5-Validations de la catégorisation de ZebraZoom

Pour évaluer la performance de cette méthode de catégorisation, l'expérimentateur entraîné précédemment cité a manuellement catégorisé 189 mouvements provenant de trois vidéos. Ces mouvements ont alors été soumis aux SVMs de ZebraZoom pour fixer des labels automatiquement. Les catégorisations fournies par l'expérimentateur de manière subjective et les catégorisations fournies par ZebraZoom ont ensuite été comparées. Sur l'ensemble de ces 189 mouvements, 82.5 % des mouvements ont été placés dans la même catégorie à la fois par l'expérimentateur et par ZebraZoom (Figure 19). En triant par catégorie, sur l'ensemble des mouvements reconnus

comme étant des nages rectilignes par l'expérimentateur, 85 % ont également été reconnus par ZebraZoom comme étant des nages rectilignes. Pour les virages, ce pourcentage est de 82 % ; et pour les réponses de fuite, il est de 79 % (Figure 19). Quatre expérimentateurs distincts (l'expérimentateur #1 correspondant à l'expérimentateur entraîné utilisé comme référence), ont réalisé des classifications manuelles sur les bases de test mais aussi d'apprentissage afin de refaire l'apprentissage des SVM pour chacun de ces expérimentateurs. Les pourcentages de bonne reconnaissance de ces quatre expérimentateurs distincts varient entre 73.2% et 82.5% pour tous mouvements confondus et sont reportés dans la Table 8.

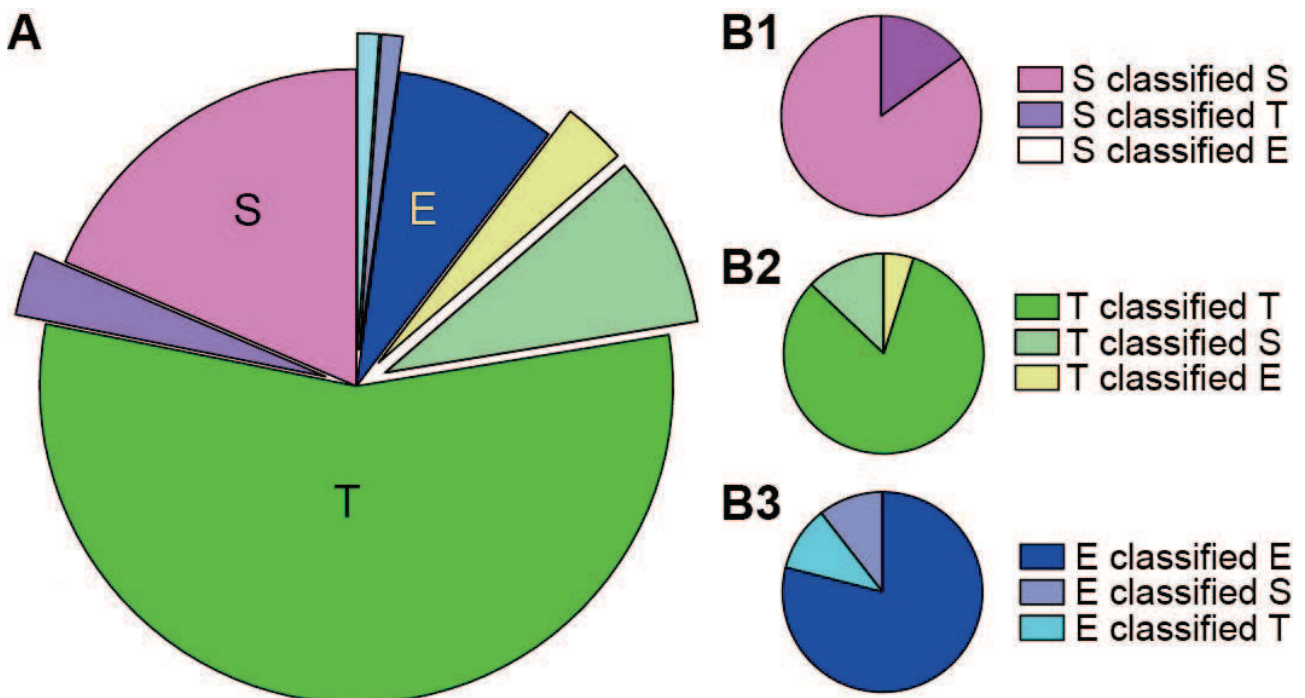


Figure 19: Validation de la classification automatique. Comparaison de la classification automatique de ZebraZoom et de celle d'un expérimentateur manuel entraîné pour tous mouvements confondus (A) et par type de comportements (B).

	Tous mouvements (%)	Nage rectiligne (%)	Virage (%)	Réponse de fuite (%)
Expérimentateur #1	82.5	85	82	79
Expérimentateur #2	73.2	85	60	53
Expérimentateur #3	74.3	73	80	58
Expérimentateur #4	75.4	79	77	47

Table 8: Estimations des taux de reconnaissance correcte de ZebraZoom à partir des classifications subjectives de quatre expérimentateurs.

Pour rappel, nous avons vu précédemment que les mouvements ambigus estimés par des désaccords entre expérimentateurs correspondent à environ 18% des cas. En prenant l'expérimentateur expérimenté comme référence, nous trouvons globalement 17,5 % de désaccord entre l'expérimentateur entraîné et ZebraZoom. Comme attendu, le taux d'erreur de ZebraZoom est proche du taux de mouvements ambigus.

Nous avons appliqué notre méthode de catégorisation sur l'ensemble de huit vidéos obtenues à partir de six portées différentes, âgées de 5 à 7 jours pour un total de 44 688 mouvements (voir Figure 12). Nous avons généré des histogrammes des différents paramètres cinétiques globaux pour les trois différents types de manœuvres (Figure 20, Figure 24, Tableau 2). Pour chaque paramètre cinétique global, les différences entre les histogrammes sont cohérentes avec chaque comportement. En particulier, la fréquence de battement de la queue la plus faible est pour les virages (21.46Hz +/- 0.03), suivi par les nages rectilignes (25.56Hz +/- 0.03) puis les réponses de fuite (30.85Hz +/- 0.07); la gamme d'angles pris par l'axe principale de la tête est plus faible pour les nages rectilignes (21.39° +/- 0.12) que pour les virages (60.86° +/- 0.19) et les réponses de fuite (86.22° +/- 0.68). Enfin, la distance parcourue et la vitesse moyenne est plus importante pour les réponses de fuite (5.51mm+/-0.03 et 28.47mm/s+/-0.15 respectivement) que pour les nages rectilignes (1.65mm+/-0.01 et 9.15mm/s+/-0.04 respectivement) et les virages (2.25mm+/-0.01 et 12.21mm/s+/-0.03 respectivement). Ces

observations fournissent donc une validation supplémentaire de la justesse de notre classification automatique. Par ailleurs, sur les 44 688 mouvements détectés, ZebraZoom a identifié 33,36% de nages rectilignes, 49,96 % de virages, et 18,67 % de réponses de fuite (Table 10) ; ce qui est également cohérent d'un point de vue biologique. Ces résultats complètent la connaissance générale des manœuvres réalisées par la larve de poisson zèbre.

	Nages rectilignes		Virages		Réponses de fuite	
	Mean	Ste	Mean	Ste	Mean	Ste
Nb. Osc.	3,51	0,01	2,69	0,01	4,06	0,03
Mean TBF (Hz)	25,56	0,03	21,46	0,03	30,85	0,07
Duration (s)	0,18	0,0006	0,19	0,0004	0,22	0,0016
Heading (degrés)	21,39	0,12	60,86	0,19	86,22	0,68
Distance (mm)	1,65	0,01	2,25	0,01	5,51	0,03
Vitesse (mm/s)	9,15	0,04	12,21	0,03	28,47	0,15

Table 9: Valeurs Moyennes et Erreurs Standards des Paramètres Globaux en fonction des catégories: Nages rectilignes, Virages, et Réponses de fuite. Paramètres de haut en bas: Nombre d'oscillations, Fréquence moyenne des battements de la queue, Durée du mouvement, Gamme d'angles de l'axe principal de la tête, Distance parcourue, Vitesse Moyenne, Fréquence des mouvements réalisés par les larves de poissons zèbre.

	Nages rectilignes	Virages	Réponses de fuite
Pourcentage	33,36	49,96	18,67
Moyen			

Table 10: Proportion de manoeuvres dans chaque catégorie: Nages rectilignes, Virages, et Réponses de fuite.

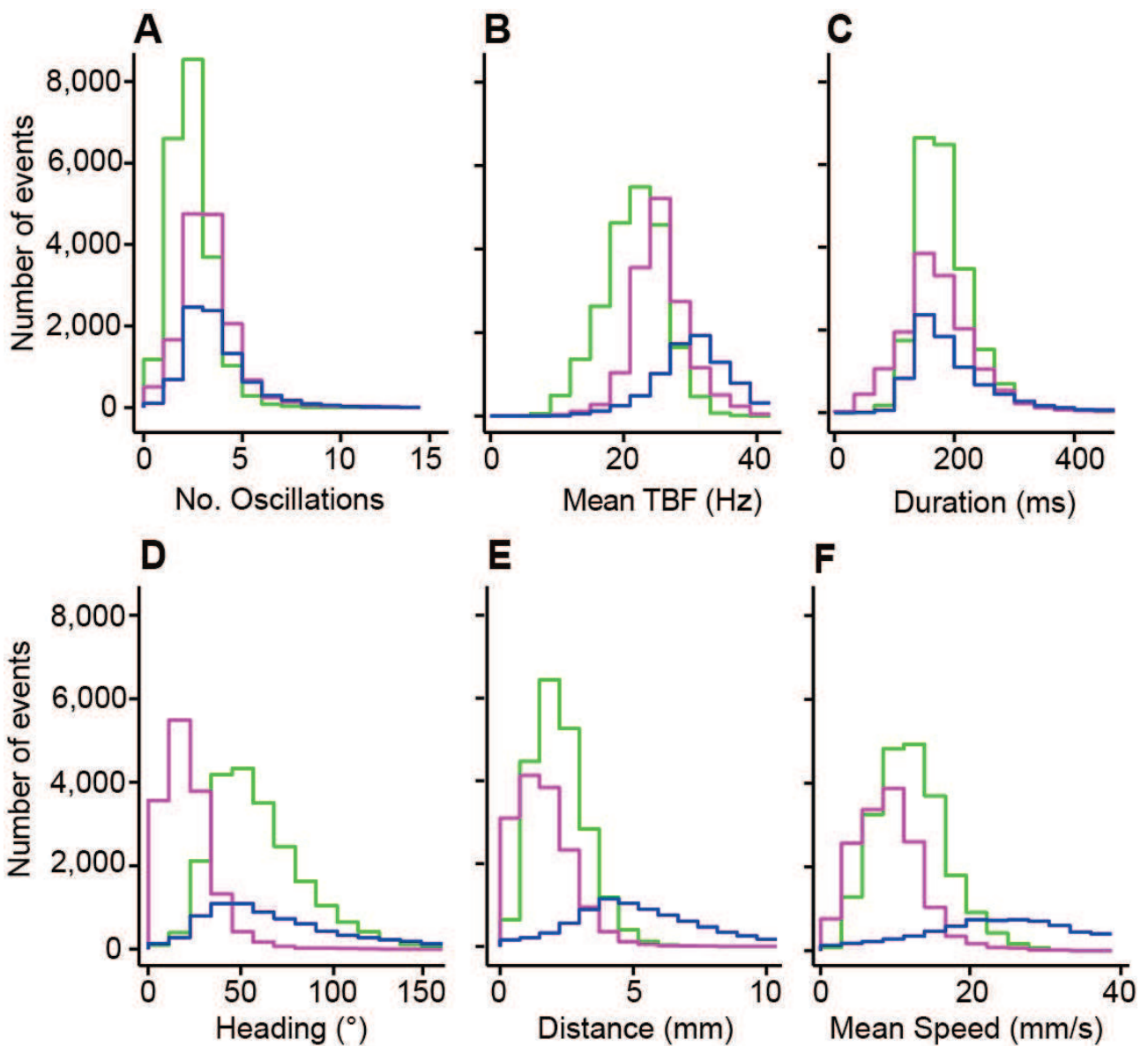


Figure 20: Paramètres globaux par comportements. A. Nombre d'oscillations. B. Moyenne de la fréquence de battements de la queue. C. Durée du mouvement. D. Angle de l'axe principale. E. Distance parcourue. F. Vitesse Moyenne

B- Application de la catégorisation de manœuvres par ZebraZoom

1-Estimation de la récurrence des manoeuvres

Une question intéressante des neurosciences intégrées et comportementales est d'établir comment des animaux distincts interagissent entre eux. Vu que ZebraZoom est capable de suivre le même individu sur des temps longs (140s en moyenne sur une vidéo de 240s avec un mouvement toutes les 2 secondes par larve en moyenne), il est possible d'analyser cette question sur des larves. Les larves de poisson zèbre à ce stade sont-elles influencées par le comportement des animaux qui les entourent? Une même larve est-elle capable de montrer des comportements propres et biaisés vers un comportement en fonction de ce qu'elle a effectué auparavant?

En estimant subjectivement les types de manœuvres réalisées par les larves de poisson zèbre sur des vidéos, plusieurs expérimentateurs ont remarqué qu'une même manœuvre avait tendance à se répéter au sein du groupe. Nous avons utilisé ZebraZoom pour analyser la récurrence des différentes manœuvres au cours du temps.

Nous avons calculé un index de transition I qui caractérise la fréquence des séquences de manœuvres «B1 précédé de B2» par rapport à la fréquence qu'aurait cette suite de manœuvres si l'apparition des diverses manœuvres au cours du temps était totalement aléatoire. On ne considère ici que les successions du premier ordre (les mouvements ayant lieu de façon successive sans mouvement intermédiaire).

Il y a 9 séquences de manœuvres possibles : SFS-SFS, SFS-Turn, SFS-ER, Turn-SFS, Turn-Turn, Turn-ER, ER-SFS, ER-Turn, ER-ER. Pour un ensemble donné de manœuvres, l'algorithme va d'abord compter l'occurrence de chacune de ces 9 séquences de manœuvres puis diviser ces nombres d'occurrence par le nombre total d'occurrence de la première manœuvre de la séquence. On obtient donc le quotient suivant :

$$\frac{Nb.Suc.(B2 \rightarrow B1)}{Nb.Man.(B2)} = \frac{\frac{Nb.Suc.(B2 \rightarrow B1)}{Nb.Suc.(\forall (j, k) \in [1; 3]^2 B_j \rightarrow B_k)}}{\frac{Nb.Man.(B2)}{Nb.Man.(\forall j \in [1; 3] B_j) - 1}} = \frac{p(x_i = B1 \wedge x_{i-1} = B2)}{p(x_{i-1} = B2)} = p(x_i = B1 | x_{i-1} = B2)$$

Avec i l'index d'un mouvement quelconque, Nb.Suc le nombre total de successions pour une séquence donnée, et Nb.Man le nombre total de manœuvres d'un certain type.

Enfin,

$Nb.Suc.(\forall (j, k) \in [1; 3]^2 B_j \rightarrow B_k) = Nb.Man.(\forall j \in [1; 3] B_j) - 1 = \text{Nombre total de Mouvements} - 1$
car on ne considère ici que les successions du premier ordre (les mouvements ayant lieu de façon successive sans mouvement intermédiaire); et le -1 peut être négligé car le nombre total de mouvements est très grand.

La grandeur calculé correspond donc à une probabilité de transition d'un comportement à un autre. Pour comparer ces probabilités de transition à des probabilités de transition aléatoire, nous divisons ces probabilités de transition par la probabilité d'occurrence du second mouvement de la succession. On obtient ainsi l'index de transition I :

$$I(B1, B2) = \frac{p(x_i = B1 | x_{i-1} = B2)}{p(x_i = B1)}$$

Or, d'après la loi de Bayes :

$$p(x_i = B1 | x_{i-1} = B2) = \frac{p(x_i = B1 \wedge x_{i-1} = B2)}{p(x_{i-1} = B2)}$$

Et on a donc alors:

$$I(B1, B2) = \frac{p(x_i = B1 \wedge x_{i-1} = B2)}{p(x_{i-1} = B2) \times p(x_i = B1)}$$

Si $(x_i = B1)$ et $(x_{i-1} = B2)$ sont deux événements indépendants, on a alors par définition :

$$p(x_i = B1 \wedge x_{i-1} = B2) = p(x_i = B1) \times p(x_{i-1} = B2)$$

et $I(B1, B2)$ sera alors égal à 1.

Autrement dit, si la séquence de manœuvres B2-B1 a une occurrence égale à celle qui aurait lieu si les manœuvres étaient réalisées de façon totalement aléatoire (c'est-à-dire : $(x_i=B1)$ et $(x_{i-1}=B2)$ indépendant), alors $I(B1,B2)$ est très proche de 1. Sinon, $I(B1,B2)$ est éloigné de 1.

2-Etudes de la succession des mouvements

Afin d'étudier les successions de mouvements chez les larves de poisson zèbre, nous avons utilisé un ensemble de données provenant de cinq vidéos différentes (et quatre portées différentes) soit 40 boîtes de pétri différentes (c'est-à-dire 180 larves différentes) réalisant un total de 36 068 mouvements. Nous avons calculé l'index de transition I pour les répétitions des mêmes manœuvres : SFS-SFS, Turn-Turn, et ER-ER. Globalement, tous animaux confondus, nous avons constaté que l'index de transition I était supérieur à 1 et que les manœuvres avaient donc tendance à se répéter au cours du temps. Puis nous avons calculé cet index de transition comme fonction d'une fenêtre de distance et de temps entre les larves au début du mouvement.

Lorsque nous calculons cet index pour des larves différentes seulement, (Figure 21B), nous avons observé que l'index de récurrence I était supérieur à 1 uniquement pour les successions des réponses de fuite ($I_{SFS \rightarrow SFS \max (diff)} = 1.09$ ($p=0.14$), $I_{T \rightarrow T \max (diff)} = 1.01$ ($p=0.06$), $I_{ER \rightarrow ER \max (diff)} = 3.6$ ($p=0.0017$)). En revanche, lorsqu'il était calculé pour la séquence de mouvement pour une larve seulement (Figure 21A), l'index de récurrence I était supérieur à 1 pour les successions de nages rectilignes, de virages, et de réponses de fuite ($I_{SFS \rightarrow SFS \max (same)} = 1.43$ ($p=0.0002$), $I_{T \rightarrow T \max (same)} = 1.37$ ($p < 0.0001$), $I_{ER \rightarrow ER \max (same)} = 2.38$ ($p < 0.0001$)).

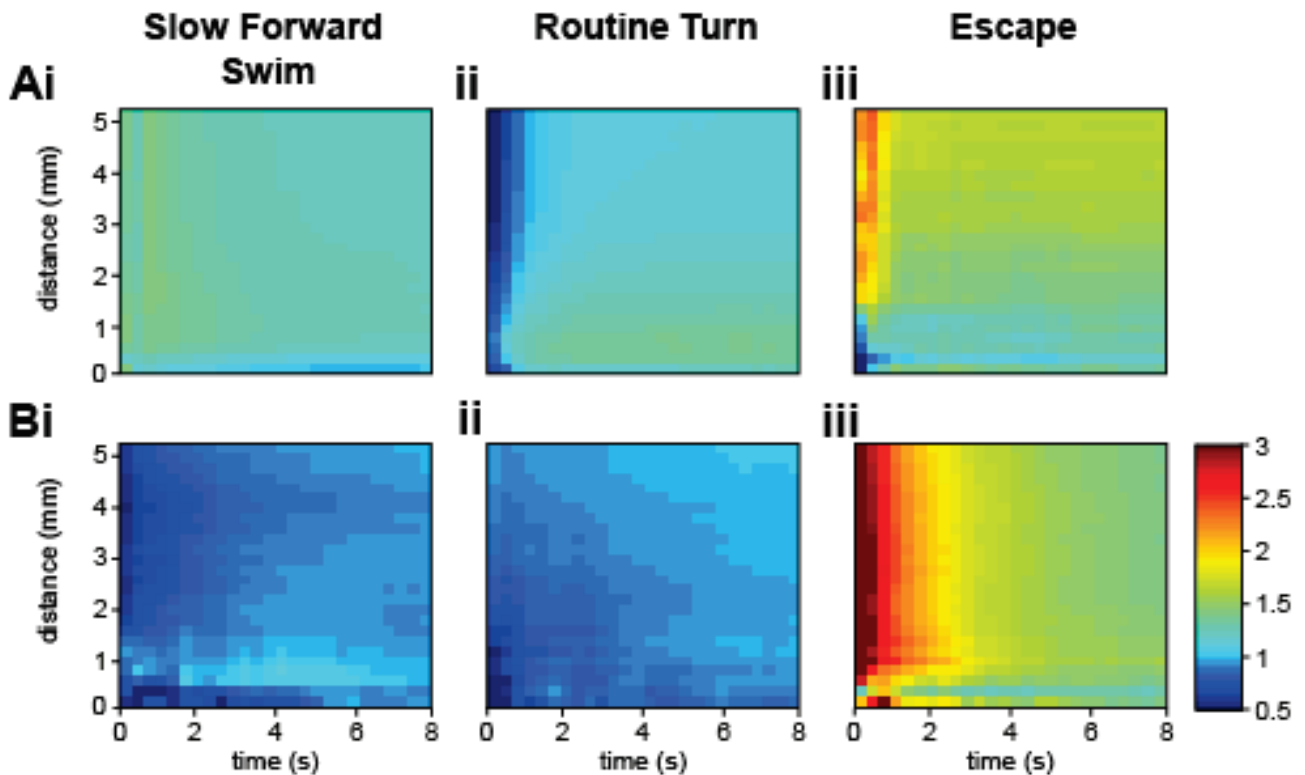


Figure 21: Index de récurrence pour des larves individuelle (A), pour des larves différentes uniquement (B), pour les SFS suivi de SFS (i), pour les Turn suivi de Turn (ii), pour les ER suivi de ER (iii), en fonction du temps (en ordonné), et de la distance (en abscisse)

Pour réaliser les tests statistiques précédemment cités et résumés dans la Table 11 ci-dessous, nous avons pour chacun des 6 graphes, testé si la valeur maximale des graphes était différente de 1. Pour cela, nous avons dans chacun de ces cas relancé 50 fois le calcul de I_{\max} , après avoir permuté de façon aléatoire les catégorisations des comportements dans la liste des mouvements détectés (seules les catégorisations ont été permutées, les numéros des poissons, position, ou temps des mouvements n'ont pas été permutés). En utilisant un ttest, nous avons alors comparé les 50 valeurs obtenues à la valeur de I_{\max} afin de déterminer si elles étaient significativement différentes de un.

	SFS -> SFS	Turn -> Turn	ER -> ER
Larves Differentes	0,14	0,0601	0,0017
Même Larve	0,0002	< 0,0001	< 0,0001

Table 11: Valeur des tests statistiques déterminant si la valeur de I_{max} est significativement différente de 1.

Les successions de réponses de fuite par des animaux distincts peuvent s'expliquer par le fait que lorsqu'une larve déclenche une fuite, elle peut percuter dans sa fuite d'autres larves ce qui peut déclencher des réponses de fuite supplémentaires. Ce phénomène de cascade de fuites est attendu. ZebraZoom a également permis de révéler la répétition des mouvements au sein d'une même larve, un phénomène non connu qui pourrait refléter un état interne de la larve.

VI-Conclusion

A-ZebraZoom, une avancée pour l'analyse du comportement moteur pour la larve de poisson zèbre

Comme nous l'avons vu, la larve de poisson zèbre est un modèle émergent de par ses nombreux avantages. Les expériences comportementales réalisées dans ce modèle sont nombreuses, mais elles ont toutes en commun la nécessité d'un phénotypage des mouvements. De par les variétés de comportement locomoteur possible, ce phénotypage doit passer par une reconnaissance du comportement et la quantification de la dynamique des mouvements. Si le phénotypage est complexe, il est utile d'observer et d'analyser les comportements moteurs lorsqu'ils ont lieu spontanément, afin de les comprendre plus en détail et d'aller au-delà d'une analyse manuelle et subjective limitée à quelques dizaines de mouvements au plus (Budick and O'Malley 2000). Le programme ZebraZoom que nous avons développé analyse le mouvement spontané de plusieurs larves se déplaçant sur plusieurs minutes. Les vidéos sont acquises à haute fréquence (337 Hz), et tête et queue sont suivies au cours du temps. Le programme sort des paramètres cinétiques globaux décrivant la dynamique des mouvements et une classification automatique en trois manœuvres distinctes a été validée. ZebraZoom remplit donc les objectifs que nous nous étions fixés en terme de système d'analyse du comportement. Rappelons maintenant en quoi ZebraZoom permet de répondre aux trois objectifs fixés dans le chapitre 1 en termes d'analyse comportementale.

Nous avons généré une technique générale de phénotypage automatique de mouvement qui pourrait être utilisée dans d'autres conditions expérimentales telles que sur des larves semi-immobilisées.

ZebraZoom a permis d'établir les valeurs moyennes et distributions des principaux paramètres cinétiques globaux décrivant les mouvements pour

toutes manœuvres confondues (Table 3, Figure 12), et au sein d'une manœuvre spécifique (Table 9, Figure 20, Figure 24), à partir de plusieurs dizaines de milliers de mouvements provenant de centaines de larves obtenues sur plusieurs portées. Lambert et collaborateurs avait précédemment trouvé chez des larves de 4 dpf une valeur moyenne de 248 ms pour le temps de parcours par larve et par bouffée natatoire ainsi qu'une distance parcourue de 38 cm par larve sur une période de 10 minutes (Lambert, Bonkowsky, and Masino 2012). ZebraZoom trouve pour des larves comprises entre 5 et 7 dpf une valeur moyenne de 189.5 ms pour le temps de parcours par larve et par bouffée natatoire ; ainsi qu'une distance parcourue de 2.49 mm par larve et par bouffée natatoire. Sachant que ZebraZoom a permis d'établir une fréquence de mouvements de 0.45 Hz, cela revient donc à une distance parcourue de 67.23 cm par larve sur une période de 10 minutes. Les différences observées s'expliquent sans doute par les différences d'âges des poissons observés.

En se basant sur ces dizaines de milliers de mouvements, ZebraZoom a également fournit une estimation des proportions moyenne de chaque type de comportement (Table 10). Burgess et Granato avait précédemment réalisé le logiciel FLOTE qui permettait une classification linéaire simple (2 paramètres utilisés) en nages rectilignes vs virages. Les pourcentages mesuré était de 49.8% pour les nages rectilignes et 50.2% pour les virages (Burgess and Granato 2007) ; contre 33.36% de nages rectilignes, 49.96% de virages, et 18.67% de réponses de fuite pour ZebraZoom. Néanmoins, rien ne prouve que l'ensemble des mouvements observés ont été catégorisés par le logiciel FLOTE et les réponses de fuite ne sont pas prise en compte dans ce logiciel. Les différences observées pourraient aussi peut-être s'expliquer par les différentes tailles des boîtes de pétri dans lesquels les comportements ont été observés : 6 cm de diamètre pour FLOTE et 2.2 cm de diamètre pour ZebraZoom.

ZebraZoom fournit également la première illustration du continuum existant entre les différents types de comportement (Figure 16, Figure 17).

Vu que ZebraZoom permet de suivre des individus sur de longues périodes et d'analyser ainsi leur comportement moteur individuel, c'est aussi un outil qui permet d'analyser de manière quantitative la nature des

interactions entre larves. En particulier, sur des larves âgées de 5 à 7 jours, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois qu'une larve de poisson zèbre a tendance à répéter la même manoeuvre au cours du temps indépendamment de la manoeuvre. Par ailleurs ZebraZoom nous a permis de démontrer pour la première fois le phénomène de cascades de réponses de fuite ayant lieu entre différentes larves (Table 11 Figure 21). Des résultats préliminaires sur les mutants *atoh7*^{-/-} montrant des résultats similaires, il semblerait donc que ces cascades de réponses de fuite soient déclenchées par un biais mécanique et non visuel.

Enfin ZebraZoom rend possible une analyse générale du comportement de mutants ou d'animaux exposés à des drogues. Comme nous l'avons montré dans des cas concrets, cela rend possible la caractérisation de l'effet comportemental d'une drogue ou d'une mutation. Ainsi, en ce qui concerne l'analyse d'une drogue, nous avons confirmé les effets observés de la strychnine dans des préparations plus biaisées que celles de ZebraZoom, et nous avons également mis en valeur des effets encore non caractérisés (Table 4 Table 5 Figure 13 Figure 22). En ce qui concerne l'analyse d'une mutation, nous avons pu observer des fines différences de comportement, jusqu'ici inconnu, chez le mutant *lak* (Table 6 Table 7 Figure 14 Figure 23).

ZebraZoom, en remplissant les objectifs fixés en termes de système d'analyse comportementale (Table 9), permet donc également de répondre aux trois objectifs fixés dans le chapitre 1 en termes d'analyse comportementale. Ce système est accessible librement et gratuitement (<http://sourceforge.net/p/zebrazoom/wiki/Home/>) et rend donc possible la mise en place d'analyses plus fines et plus quantitatives du comportement dans les expériences impliquant la larve de poissons zèbre.

B-Le futur de l'analyse du comportement des poissons zèbre

1-Optimiser le tracking au niveau précision et rapidité

Le système de tracking de ZebraZoom repose, comme pour la plupart des systèmes de tracking fait pour la larve de poisson zèbre jusqu'à maintenant, sur une approche assez simple "par blob" (Lindeberg and Eklundh 1990). Comme nous l'avons vu précédemment, cette approche mène déjà à des résultats satisfaisants. Néanmoins, comme expliqué dans le chapitre III, quelques erreurs sont possibles du fait notamment des contacts entre larves. Pour améliorer le tracking, il serait nécessaire d'utiliser des techniques plus sophistiquées reposant par exemple sur des modèles des déplacements (voir (Fontaine et al. 2008)).

Par ailleurs ZebraZoom nécessite plusieurs heures de traitement avant de fournir ses résultats finaux. Le programme en lui même n'a pas été optimisé pour opérer rapidement. Encore une fois, ZebraZoom n'en reste pas moins un outil tout à fait utilisable et utile, mais une accélération du temps d'exécution du programme de tracking rendrait ZebraZoom encore plus utile et facile d'accès. Comme cela a été fait chez le *C.Elegans* (Swierczek et al. 2011), l'idéal est en fait de réaliser le tracking en temps réel de manière à ne pas avoir à stocker la vidéo sur un disque mais au contraire de gérer les images au fur et à mesure qu'elles arrivent. Néanmoins, le *C.Elegans* réalisent des mouvements moins rapides que ceux de la larve de poisson zèbre, et des vidéos filmées à 30Hz sont généralement suffisantes pour capturer toute la complexité des mouvements. Pour la larve de poisson zèbre, les vidéos doivent être capturées au minimum à 300 Hz, ce qui complique le traitement en temps réel et implique probablement l'utilisation de matériel informatique spécifique tel que les FPGA (Monmasson and Cirstea 2007).

Outre les gains de temps et d'espace disque, un tracking en temps réel rend également possible des manipulations expérimentales en fonction des comportements réalisés par les larves. Par exemple, un tracking en temps réel pourrait permettre d'effectuer des manipulations optogénétique à des moments précis de la locomotion des larves et aussi en fonction des

comportements réalisés par celles-ci. Ce genre d'expérience a déjà été réalisé chez les *C.Elegans* (Leifer et al. 2011), pour qui comme nous l'avons dit précédemment une fréquence d'acquisition des vidéos de seulement 30 Hz est nécessaire. Il serait néanmoins intéressant de réaliser ce genre d'expérience d'optogénétique en temps réel chez les larves de poisson zèbre, de par le fait notamment qu'ils soient des vertébrés, et donc plus proche de l'homme.

2- D'autres descripteurs du comportement

ZebraZoom calcule des paramètres décrivant globalement la dynamique des mouvements et fournit une catégorisation en comportement distincts. Néanmoins, dans certaines expériences spécifiques d'autres descripteurs du comportement pourraient être utiles : par exemple la localisation des poissons dans l'espace, leurs interactions ou encore les trajectoires des larves.

La localisation des poissons dans l'espace n'est en effet pas une information donnée par ZebraZoom. Elle pourrait néanmoins être utile dans certains cas bien spécifiques, par exemple dans le cas des analyses des processus d'apprentissage dans lesquelles on cherche bien souvent à quantifier les quantités de temps passé dans les différentes zones de la boîte de pétri. Ceci pourrait être simplement calculé en utilisant des paramètres globaux, mais d'autres approches seraient également possibles, par exemple grâce à l'analyse des transitions d'une zone de l'espace à une autre (Faure et al. 2003).

Comme vu précédemment, ZebraZoom permet d'analyser les suites de mouvements au sein de poissons individuels et de poissons différents. Néanmoins, il existe d'autres interactions possibles entre poissons qui ne sont pas calculées par ZebraZoom, et qui pourraient être utiles dans des cas très spécifiques. Des paramètres globaux pourraient ainsi être utilisés pour quantifier différentes interactions : le nombre de contacts entre animaux, la durée des contacts, la distance entre deux larves différentes au cours du temps... En effet, même si les poissons zèbre ne montrent pas de comportement social apparent au stade larvaire (Buske and Gerlai 2011), l'analyse des interactions peut tout de même être utile par exemple pour

l'étude des interactions mécaniques entre larves (ayant lieu par exemple lors des cascades d'Escape Response).

Enfin, les paramètres globaux décrivant la dynamique des mouvements calculés par ZebraZoom reflète en grande partie les trajectoires des animaux, néanmoins une partie de l'information sur ces trajectoires est perdue. Des systèmes permettant de détecter des anomalies de trajectoires dans des environnements naturels marins ont par exemple déjà été créés et pourraient être adaptés pour ZebraZoom (Beyan and Fisher 2012).

3-De meilleurs paramètres dynamiques pour représenter la complexité du mouvement

ZebraZoom possède un système de classification automatique des mouvements en différents comportements stéréotypes. Comme nous avons pu le montrer précédemment, cette classification a été validée et permet d'aboutir à des conclusions biologiques intéressantes. Néanmoins, cette classification automatique repose sur des paramètres dynamiques extraits à partir de l'angle de la queue. Afin d'améliorer les performances du classifieur, il pourrait donc sans doute être utile d'utiliser des paramètres décrivant de façon encore plus complète la locomotion des larves. Une option pourrait ainsi être d'utiliser la courbure précédemment citée. Une autre option pourrait également être de chercher des paramètres décrivant de façon vraiment complète la locomotion de ces larves. Chez le *C.Elegans*, certains auteurs ont ainsi pu trouver des paramètres décrivant de façon exhaustive l'ensemble des formes (proches de celles de la larve de poisson zèbre) que peuvent prendre le *C.Elegans* (Stephens et al. 2008). Une possibilité serait d'essayer de généraliser ces paramètres à la larve de poisson zèbre et de se baser sur ceux-ci pour trouver des paramètres décrivant de façon exhaustive un mouvement (et donc pas uniquement la forme de l'animal à un instant donné).

4-Prise en compte du continuum comportemental dans les algorithmes de catégorisation

Grâce à ZebraZoom, nous avons pu fournir la première illustration du continuum existant de façon très probable entre les différents comportements stéréotypés de la larve de poisson zèbre. Démontrer ce résultat de façon très rigoureuse serait en soi un résultat très important d'un point de vue général en ce qui concerne l'analyse du comportement animal. Par rapport à ce que nous avons fait, il serait sans doute nécessaire pour cela d'augmenter le nombre de mouvements étudiés sur ce sujet, d'augmenter le nombre d'expérimentateurs réalisant des classifications manuelles, et d'avoir des paramètres décrivant de façon totalement exhaustive les comportements (VI-B-3).

Outre le fait d'obtenir un résultat général sur l'analyse du comportement animal, cela ouvrirait aussi la voie à la mise en place d'algorithmes de catégorisations automatiques du comportement prenant en compte ce continuum. On pourrait par exemple envisager la mise en place d'un algorithme fournissant une quantification du degré d'appartenance à chacune des catégories de mouvements, plutôt qu'une catégorisation binaire en un seul comportement stéréotypé donné.

C- Perspectives

L'approche prise par ZebraZoom consiste simplement en la catégorisation de chaque mouvement détecté en un des trois grands types de comportement stéréotypé de la larve de poisson zèbre : la nage rectiligne (SFS), le virage (Turn), et la réponse de fuite (ER). Mais le répertoire locomoteur de la larve de poisson zèbre est en réalité bien plus riche. Ainsi, un groupe de chercheurs a très récemment publié un article décrivant un répertoire de plus de deux cents comportements qui peuvent être réalisés dans diverses conditions par le poisson zèbre au stade adulte et larvaire (lié à des comportements d'anxiété, de peur, de cognition, lié à la récompense, à la douleur, aux capacités sensorielles, au sommeil, ou encore aux problèmes neurologiques) (Kalueff et al. 2013). Certains auteurs ont également créé des larves de poisson zèbre mutant au niveau des gènes contrôlant la locomotion (Granato et al. 1996), et ont alors observé des comportements très spécifiques n'ayant généralement pas lieu de façon naturelle (par exemple des comportements où la queue des larves de poisson zèbre réalise des mouvements "en accordéon"). Enfin, il serait également tout à fait possible de distinguer parmi un certain type de comportement, les comportements associés aux différents âges où les mouvements sont effectués, étant donné la variabilité des comportements en fonction des âges (Lambert, Bonkowsky, and Masino 2012).

Finalement, on se rend donc bien compte que même si une catégorisation en nage rectiligne (SFS), virage (Turn), et réponse de fuite (ER) constitue la première étape et aboutit à des résultats intéressants, il n'en reste pas moins que le comportement locomoteur de la larve de poisson zèbre est en réalité bien plus riche. Si des paramètres dynamiques décrivant le mouvement de la larve de poisson zèbre de façon extrêmement complète (VI-B-3) sont mis en valeur et extraits à partir de programmes tel que ZebraZoom, il sera sans doute alors possible d'associer des valeurs de ces paramètres dynamiques à tous les comportements que la larve de poisson zèbre peut réaliser. De façon un peu futuriste, on pourrait même imaginer la création d'un espace de

partage sur Internet où les valeurs des paramètres dynamiques correspondant à différents comportements (et/ou à différentes conditions expérimentales) pourraient être accessibles à tous. Bien que très futuriste, ce véritable atlas du comportement rendrait possible une analyse sans précédent du comportement grâce au partage d'informations concernant possiblement des centaines de comportements différents représentés avec le même jeu de paramètres dynamiques.

Abréviations

SFS : Slow forward swim : Nage rectiligne

Turn : Routine turn : Virage

ER : Escape response : Réponse de fuite

LED : Light-emitting diode : Diode électroluminescent

2D : Two dimensions : Deux dimensions

SVMs : Support vector machine : Machine à vecteurs de support

FPGA : Field-programmable gate array : Réseau de portes programmables *in situ*

lak : lakritz

dpf : days post fertilisation : jours post fertilisation

NIH : National Institutes of Health

FAP : Fixed Action Pattern : Schème d'action spécifique

CPG : Central Pattern Generator : Réseau locomoteur spinal

Annexe 1: Figures Supplémentaires

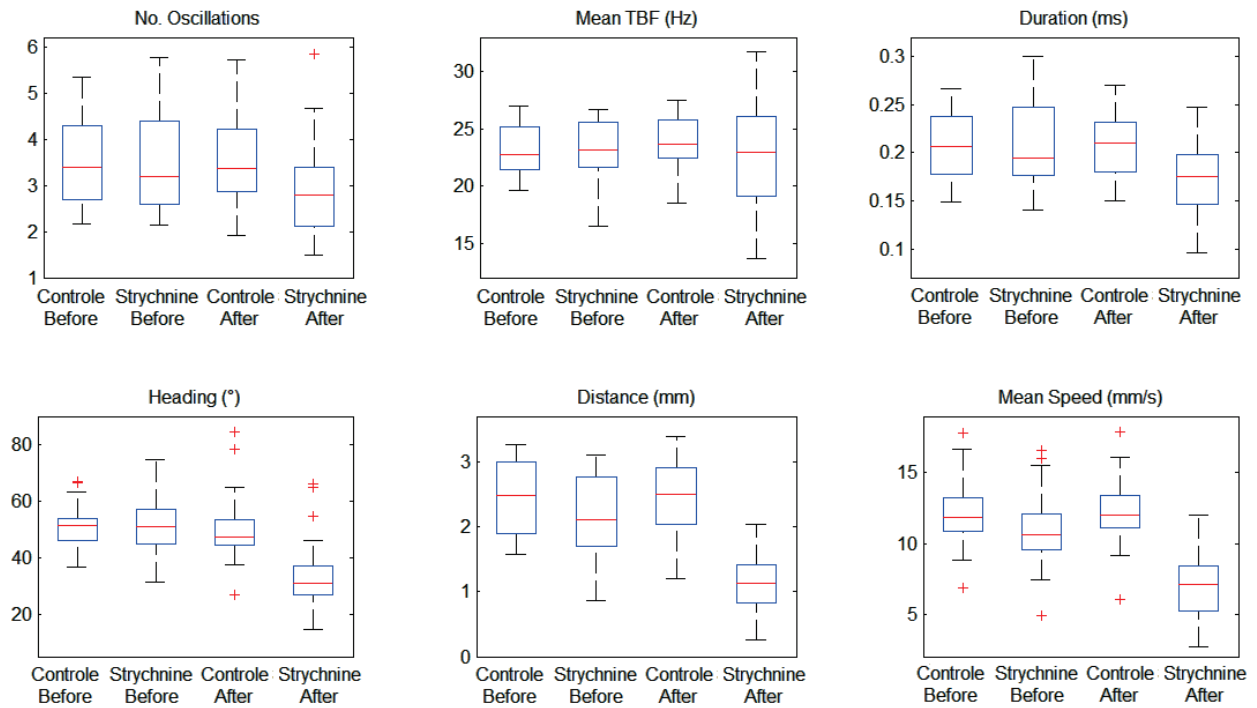
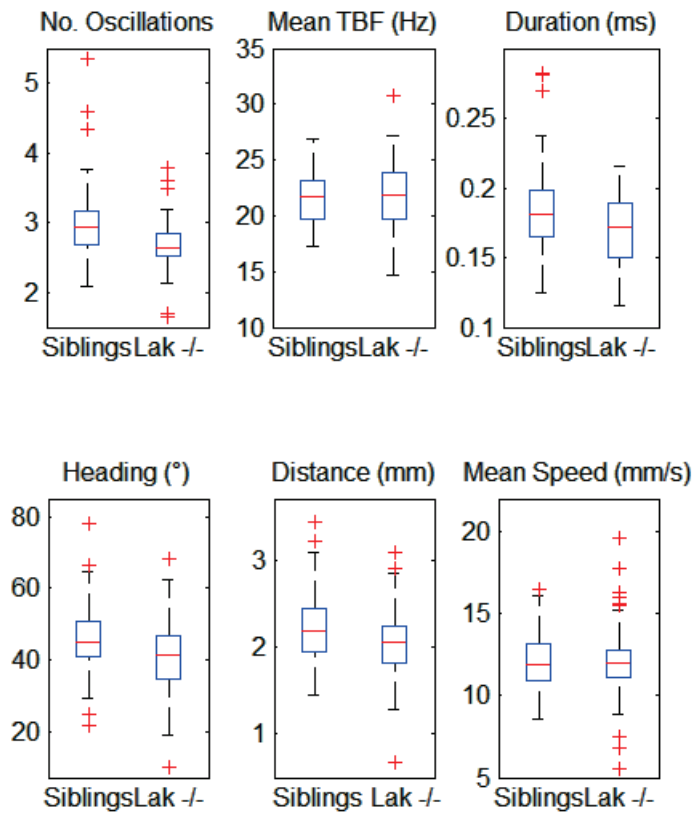


Figure 22 Effet de la strychnine sur les paramètres globaux décrivant le mouvement. Représentation par diagrammes en boîte. De gauche à droite et de haut en bas: Nombre d'oscillation, Moyenne de la fréquence de battements de la queue, Durée du mouvement, Angle de l'axe principale, Distance parcourue, Vitesse Moyenne

Figure 23 Effet de la strychnine sur les paramètres globaux décrivant le mouvement. Représentation par diagrammes en boîte. De gauche à droite et de haut en bas: Nombre d'oscillation, Moyenne de la fréquence de battements de la queue, Durée du mouvement, Angle de l'axe principale, Distance parcourue, Vitesse Moyenne



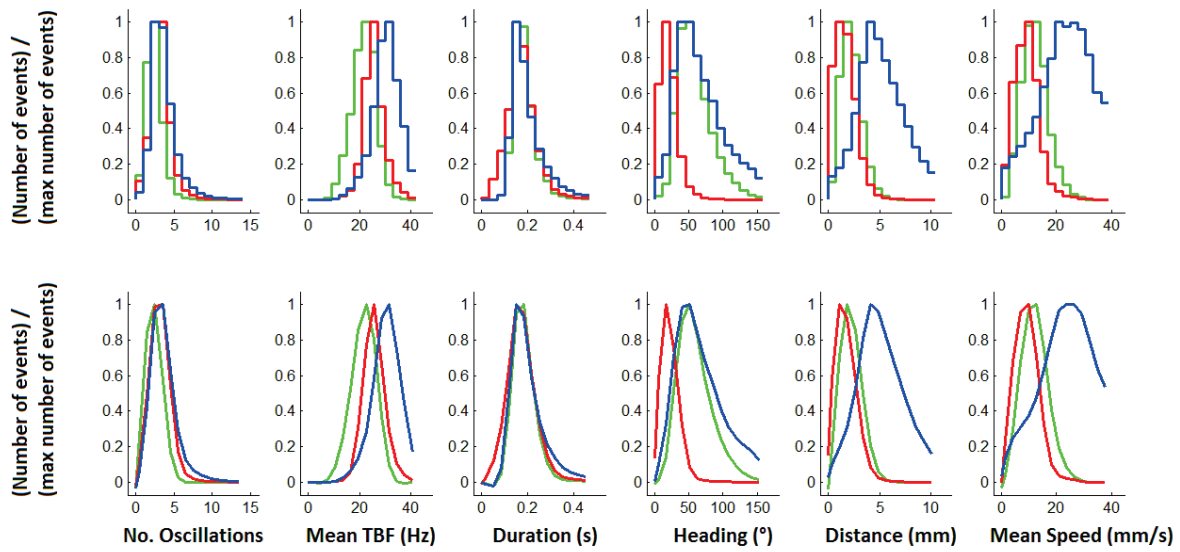


Figure 24: Paramètres globaux par comportements. Histogramme Normalisé (première ligne) et interpolé par une spline et normalisé (deuxième ligne). De gauche à droite: Nombre d'oscillation, Moyenne de la fréquence de battements de la queue, Durée du mouvement, Angle de l'axe principale, Distance parcourue, Vitesse Moyenne.

Annexe 2: Article publié dans Frontiers in Neural Circuits



ZebraZoom: an automated program for high-throughput behavioral analysis and categorization

Olivier Mirat^{1,2}, Jenna R. Stemberg^{1,3}, Kristen E. Severi¹ and Claire Wyart^{1*}

¹ Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Épineière, UPMC, Inserm UMR S975, CNRS UMR 7225, Fondation ICM, Campus Hospitalier Pitié Salpêtrière, Paris, France

² Université Paris Descartes, Paris, France

³ Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Edited by:

Gonzalo G. De Polavieja, Instituto Cajal. CSIC, Spain

Reviewed by:

Kristin Branson, HHMI Janelia Farm Research Campus, USA

Alfonso Perez-Escudero, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spain

*Correspondence:

Claire Wyart, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Épineière, Inserm U975, CNRS UPMC UMR 975, Fondation ICM, Campus Hospitalier Universitaire, Pitié-Salpêtrière, 83, Bld de l'hôpital, 75013 Paris, France
e-mail: claire.wyart@icm-institute.org

The zebrafish larva stands out as an emergent model organism for translational studies involving gene or drug screening thanks to its size, genetics, and permeability. At the larval stage, locomotion occurs in short episodes punctuated by periods of rest. Although phenotyping behavior is a key component of large-scale screens, it has not yet been automated in this model system. We developed ZebraZoom, a program to automatically track larvae and identify maneuvers for many animals performing discrete movements. Our program detects each episodic movement and extracts large-scale statistics on motor patterns to produce a quantification of the locomotor repertoire. We used ZebraZoom to identify motor defects induced by a glycinergic receptor antagonist. The analysis of the blind mutant *atoh7* revealed small locomotor defects associated with the mutation. Using multiclass supervised machine learning, ZebraZoom categorized all episodes of movement for each larva into one of three possible maneuvers: slow forward swim, routine turn, and escape. ZebraZoom reached 91% accuracy for categorization of stereotypical maneuvers that four independent experimenters unanimously identified. For all maneuvers in the data set, ZebraZoom agreed with four experimenters in 73.2–82.5% of cases. We modeled the series of maneuvers performed by larvae as Markov chains and observed that larvae often repeated the same maneuvers within a group. When analyzing subsequent maneuvers performed by different larvae, we found that larva–larva interactions occurred as series of escapes. Overall, ZebraZoom reached the level of precision found in manual analysis but accomplished tasks in a high-throughput format necessary for large screens.

Keywords: machine learning, tracking, analysis of kinematics, collective behavior, support vector machine classifier, multiclass categorization, locomotion in intact behaving animals

A central question in systems neuroscience is how neural circuit assembly and function relate to animal behavior. Genetic screens in invertebrate models, such as *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* have begun to unravel the genetic basis of circuit function and behavior (Chalfie et al., 1985; Moore et al., 1998; Scholz et al., 2000). Automated methods have recently been developed in these species to track the position of individuals alone or in a group (Branson et al., 2009; Swierczek et al., 2011) and to categorize behavior (Dankert et al., 2009; Kabra et al., 2013). The zebrafish has emerged as an important vertebrate model organism for developmental biology, neurobiology, and human disease models, and is now used as a genetic model organism for the study of the mechanisms modulating complex behaviors in vertebrates such as depression and anxiety (Blaser et al., 2010; Lee et al., 2010; Cachat et al., 2011; Vermoesen et al., 2011; Zakhary et al., 2011; Ziv et al., 2013), sleep (Zhdanova et al., 2001; Appelbaum et al., 2009), or addiction (Petzold et al., 2009; Khor et al., 2011). The permeability, small size, genetic tractability, transparency, and low cost of zebrafish make them highly suitable for large-scale genetic and chemical screens (Driever

et al., 1996; Granato et al., 1996; Haffter and Nusslein-Volhard, 1996).

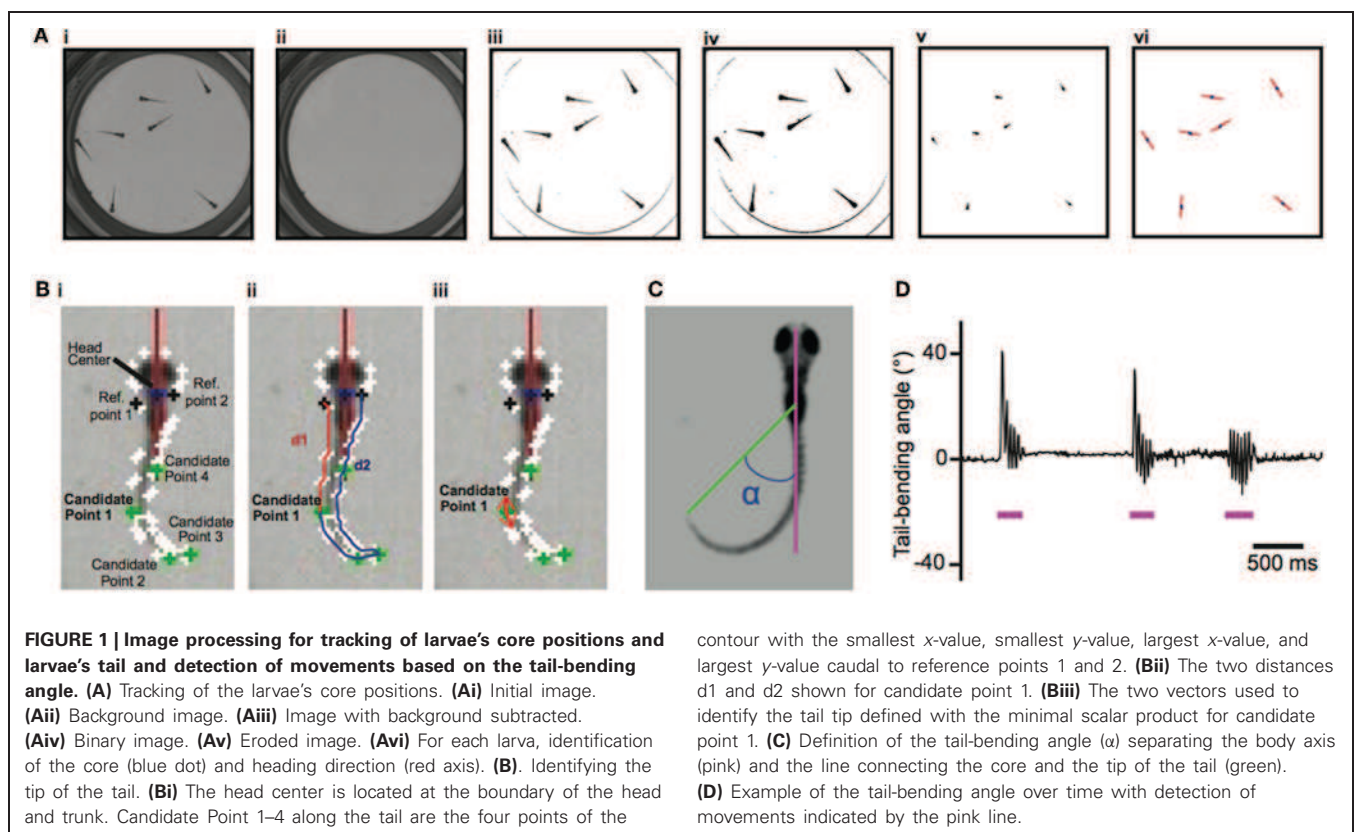
Although simple for a vertebrate, the locomotor patterns of the zebrafish larva bring technical challenges to automated analysis. Larvae spontaneously swim in discrete bouts in a manner often described as “beat and glide,” which can be classified as individual maneuvers, including slow forward swim, routine turn, or escape. These short movements are characterized by a large range of tail-beat frequencies (15–100 Hz), which require high-speed imaging to capture accurately and can be separated by long resting periods of up to a few seconds. Manual tracking via frame-by-frame analysis has formed the basis of contemporary knowledge and has enabled initial characterization of the larval zebrafish locomotor repertoire (Budick and O'Malley, 2000; Borla et al., 2002; McElligott and O'Malley, 2005). However, manual techniques are both laborious and limited in scope for high-throughput screens (Driever et al., 1996; Granato et al., 1996; Haffter and Nusslein-Volhard, 1996). The currently available automated tools have limitations in either refinement or time-scale. Recent chemical or genetic screens have relied on commercial software that estimates

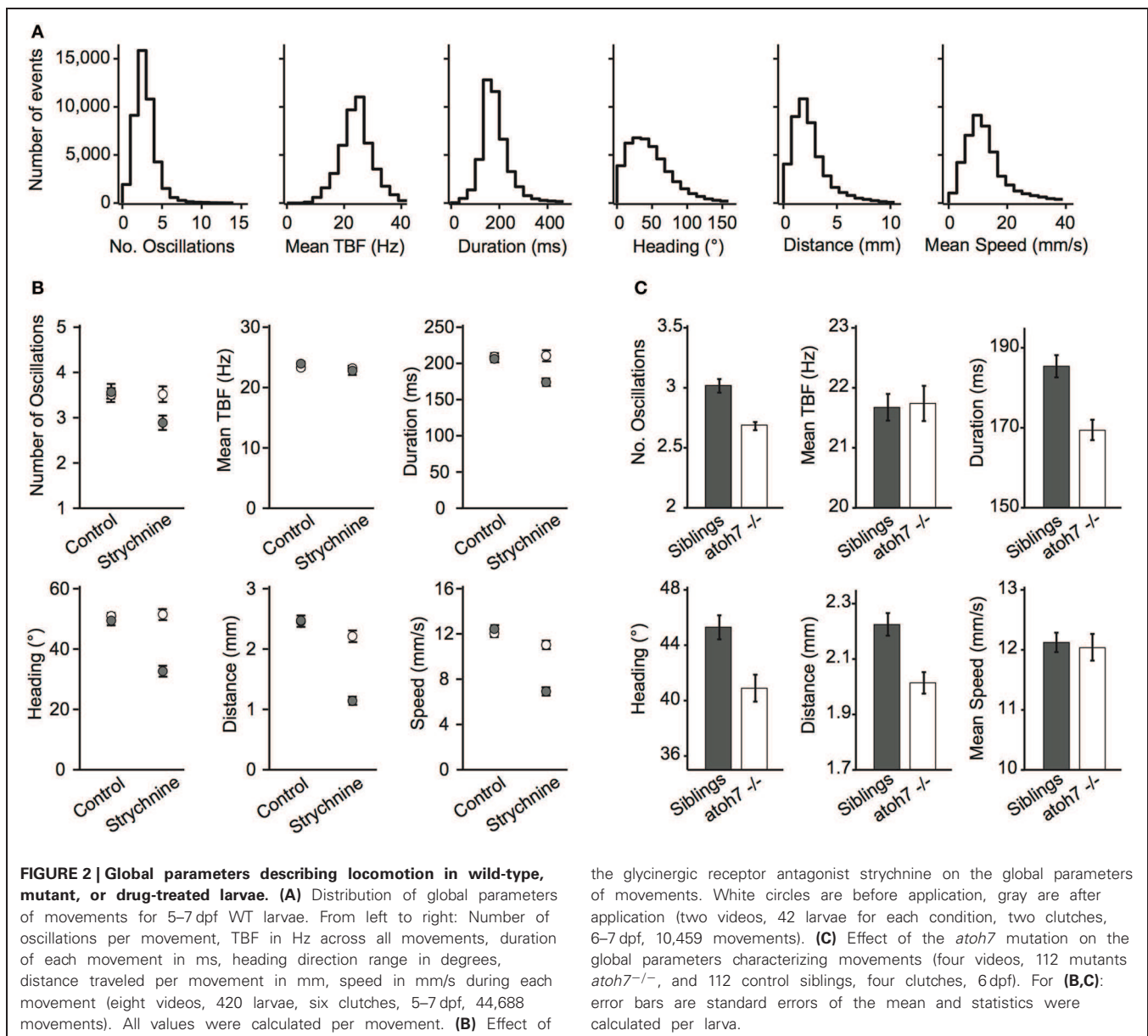
an index of mobility of the larvae, usually measured as the distance traveled during a recording session or the amount of time spent moving (Rihel et al., 2010; Elbaz et al., 2012; Rihel and Schier, 2012). These approaches for high-throughput screens provide information about average velocity and distance traveled by tracking the animals' center-of-mass over minutes to hours. Previous studies have either focused on analyzing movement duration and speed at low frequency over long periods of time or on fine analysis of kinematics at high frequency but for very short acquisition (typically 1000 ms, Burgess and Granato, 2007; Liu et al., 2012). Accurate categorization of maneuvers for each individual in a group requires novel methods to record behavior with high temporal resolution and over long durations, automatically tracking and categorizing thousands of maneuvers.

Here we developed a new program, ZebraZoom, to track the full body position over a multiple-minute timescale of 56 larvae simultaneously recorded at high frequency and to finely characterize each maneuver. To identify core and tail positions for large datasets, videos were obtained on multiple larvae simultaneously over long periods of time and at high resolution using a high-speed camera run in a streaming-to-disk interface (Methods). Typically 500–1000 movements from seven larvae were recorded per dish in four minutes and eight dishes were monitored in parallel. To simplify tracking, we placed larvae in conditions that reduced overlapping in the z-plane during swimming (Methods; overlaps occurred on average once every 145 s per larva). We developed an offline 2D tracking method for identifying and separating each animal even when in close contact (Methods,

Figure 1). For each larva several features were identified, a core position that included the head and swim bladder (**Figure 1A**) and ten points along the tail (Methods and **Figure 1B**; **Video S1**). As movements occurred as discrete episodes, ZebraZoom detected movements based on the tail-bending angle over time (Methods and **Figures 1C–D**). To validate the accuracy of movement detection, one trained experimenter manually identified all movements occurring in a subset of videos. In three videos representing a total of 189 events, movements occurred with a false negative rate of 2.7% and a false positive rate of 3.7%.

To quantify movements in a consistent manner, we used the location of the head, the position of the tail, the heading direction and the tail-bending angle to estimate global parameters of locomotion (**Figure 2A**, Methods). We observed that movements for 5–7 dpf wild-type (WT) larvae occurred every 2.22 s on average per larva (at 0.4495 ± 0.0117 Hz). For all movements identified, larvae performed on average 3.19 ± 0.01 oscillations per movement, had a 24.29 ± 0.03 Hz tail-beat frequency (TBF), lasting 189.5 ± 0.0004 ms with a $51.14 \pm 0.18^\circ$ heading direction range, 2.49 ± 0.008 mm traveled distance and 13.35 ± 0.04 mm/s speed per maneuver. We illustrated the use of ZebraZoom for quantifying the effects of a known glycinergic receptor antagonist, and for analyzing a blind genetic mutant. Glycine is responsible for reciprocal inhibition in the spinal cord that permits left-right alternation to sustain oscillations (Dale, 1985; Grillner et al., 1995; Granato et al., 1996; Drapeau et al., 2002; Li et al., 2004). In zebrafish, mutants for glycinergic receptors or transporters have been associated with defects in motor pattern generation





(Granato et al., 1996; Odenthal et al., 1996; Hirata et al., 2005; Masino and Fetcho, 2005). We measured the effect of bath application of 75 μ M strychnine on spontaneous locomotor activity in larvae and compared to control siblings that were not exposed to the drug (Figure 2B, Methods). For control larvae, we did not observe a significant change in the occurrence of movements over time (0.35 ± 0.05 movements per larva/s before and 0.27 ± 0.03 movements per larva/s after), or on any of the global parameters (Figure 2B; all $p > 0.15$). However the locomotor behavior of larvae treated with strychnine was significantly impacted (Figure 2B). Overall, movements occurred less frequently (0.30 ± 0.04 Hz before and 0.12 ± 0.02 Hz after, $p < 0.0002$). Although the average TBF during a movement did not change ($p > 0.81$), the number of oscillations decreased (3.52 ± 0.17 before and 2.89 ± 0.16 after; $p < 0.0078$), an effect that was associated with a

decrease in movement duration ($p < 0.0001$), distance traveled ($p < 10^{-5}$), and average speed ($p < 10^{-5}$). Strychnine application also resulted in a decrease in the range of heading direction ($p < 10^{-5}$). *atoh7* mutant larva lack retinal ganglion cells, rendering them blind (*atoh7*^{-/-}, Kay et al., 2001). Considering the importance of vision for zebrafish larvae, analyzing their locomotor output could reveal corresponding behavioral differences. Overall *atoh7*^{-/-} mutants generated episodic movements less frequently than control siblings (0.33 ± 0.02 Hz vs. 0.51 ± 0.02 Hz, 112 larvae for each condition). Quantitative analysis of global parameters of the blind mutants showed no difference in the average TBF or the average speed per larva (Figure 2C; $p > 0.85$ and $p > 0.83$, respectively) but there were small but significant decreases in the number of oscillations, duration, heading direction range, and distance traveled (Figure 2C; all $p < 10^{-3}$).

These defects were observed systematically in four clutches. *atoh7^{-/-}* mutants thus display small but substantial differences in basic motor behavior when compared to control siblings.

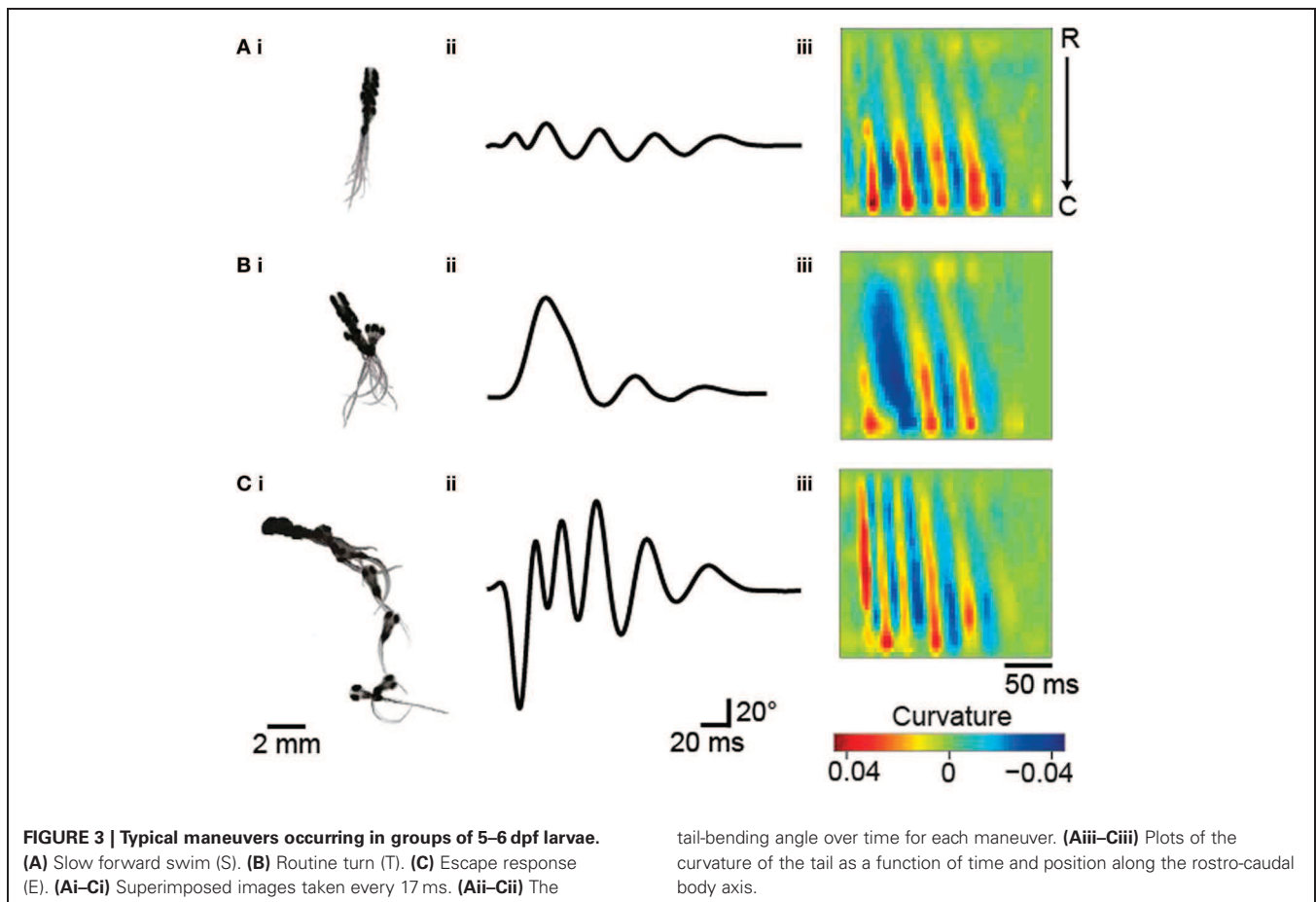
Zebrafish larvae display a variety of locomotor maneuvers that are often grouped into discrete categories. In these experimental conditions, three types of movement occur in groups of larvae at early stages: slow forward swims (S), routine turns (T, also referred to as slow turns), and escapes (E, including C-turns or burst swims). **Figure 3** shows examples of these movements reported by ZebraZoom. For each maneuver, we superimposed a succession of images (**Figures 3Ai–Ci**), the tail-bending angle over time (**Figures 3Aii–Cii**) and the curvature along the rostro-caudal axis and as a function of time (**Figures 3Aiii–Ciii**). The three types of maneuvers included a series of slow left-right alternation; high values of curvature were confined to the caudal tail (**Figures 3Aiii–Ciii**). While high values of curvature of the tail were confined to the caudal end for slow forward swims (**Figure 3Aiii**), high values of curvature were distributed from head to tail for routine turns and escapes (**Figures 3Biii, Ciii**). Stereotypical routine turns and escapes differed by the frequency of left-right alternation in the tail bend (**Figures 3Biii, Ciii**). As larvae did not always exhibit a canonical slow forward swim, routine turn or escape, some movements were ambiguous. To estimate the percentage of these movements, four experimenters subjectively classified 390 movements distributed over eight

videos. Overall about 82% of all movements were classified uniformly by at least three out of four experimenters (Methods) indicating that 18% of movements were difficult to categorize.

Using knowledge of stereotypical locomotor events, we designed a multiclass categorization approach with supervised machine learning to automatically sort each movement into one of the three categories. To implement the multiclass categorization, we used two successive support vector machine (SVM) classifiers: the first classifier sorted S vs. all other maneuvers, and when necessary the second classifier sorted T vs. E. Locomotor events were segregated subjectively in the training set ($n = 201$). This machine learning approach relied on associating dynamic parameters extracted from the tail-bending angle over time with each maneuver type identified in the training set (**Figure 4A** and Methods). To reduce the dimensionality of the data, we

Table 1 | Estimation of ZebraZoom categorizing accuracy based on the different reference experimenters.

	All movements (%)	S (%)	T (%)	E (%)
Experimenter #1	82.5	85	82	79
Experimenter #2	73.2	85	60	53
Experimenter #3	74.3	73	80	58
Experimenter #4	75.4	79	77	47



performed Principal Component Analysis (PCA). Based on the selection of a trained experimenter on the learning set, we validated the multiclass categorization to sort maneuvers by comparison with the subjective classification performed by a trained experimenter for a recognition set ($n = 189$; **Figures 4B,C**). We observed that ZebraZoom agreed with the trained experimenter 82.5% of the time for the recognition dataset (85% for S, 82% for T, and 79% for E; **Figures 4B,C**; **Table 1** and Methods). When compared to four independent experimenters, ZebraZoom reached 91% accuracy for categorization of stereotypical maneuvers that all experimenters had unanimously identified and 76.4% on average for all maneuvers (73.2–82.5%, **Table 1**). Once validated, we applied the ZebraZoom categorization algorithm on a large dataset of 44,688 movements of WT larvae (**Figure 4D**). We identified 14,911 S (33.36%), 21,432 T (49.96%), and 8,345 E (18.67%). The distribution of global parameters for the three classes of maneuvers were similar in terms of number of oscillations and duration, but they differed in terms of mean TBF, heading direction range, distance traveled and speed (**Figure 4D**).

The investigation of interactions between individuals leading to coordinated motion in animal groups has been a long-standing challenge that is central to elucidating the mechanisms and evolution of collective behavior. Most studies have focused on the analysis of speed or directionality to reflect the interaction between animals (Katz et al., 2011; Gautrais et al., 2012). We availed ourselves of ZebraZoom's features to accurately identify each larva and categorize their maneuvers to study how larvae interacted. In comparison to juvenile and adult zebrafish that swim continuously, larval zebrafish swim episodically with maneuvers that occur in a beat-and-glide manner. Each movement can be regarded as a discrete event, therefore we were motivated to explore how local perturbations of a single individual could impact the group. The program switched identity of larvae once every 109 s (once every 49 movements on average), allowing us to track single larvae. We modeled sequences of maneuvers performed by larvae within a group as Markov chains. Utilizing the classifier, we described larva–larva interactions in a group and intrinsic properties of individuals. We calculated a transition index (I) for each sequence of two maneuvers as the transition probability between first and second maneuvers divided by the probability of random occurrence of the second maneuver (**Figure 5**; **Table 2** and Methods). When the two successive maneuvers were the same, a higher transition index indicated the probability of repetition of this maneuver was greater than chance. The transition index was equal to one when the order of sequential maneuvers was random. Overall I was greater than one for repetition of the same maneuvers (**Table 2**). We sorted the data into interactions between different animals and the repetition within the same animal. We analyzed how the transition index for a given succession of maneuvers depended on the distance between the two larvae's core positions at the onset of the movement and the time between the onset of each movement (**Figure 5** and Methods). Individual larvae often performed the same type of maneuver sequentially (maximal values $I_{S \text{ max (same)}} = 1.43$, $I_{T \text{ max (same)}} = 1.37$, $I_{E \text{ (same)}} = 2.38$, all $p < 0.002$; **Figure 5A**,

Table 2, and Methods). Although slow forward swims or routine turns were not frequently repeated between larvae (I close to 1: maximal values $I_{S \text{ (diff)}} = 1.09$ and $I_{T \text{ (diff)}} = 1.01$, $p > 0.05$; **Figures 5Bi,ii**, **Table 2**, and Methods), we found that recurrent escapes were very frequent between different larvae (maximal value $I_{E \text{ (diff)}} = 3.6$, $p < 0.002$; **Figure 5Biii**, **Table 2**, and Methods). Five to seven dpf larvae do not show evidence for social interactions (Buske and Gerlai, 2011). By taking advantage of the algorithm for identifying single larva and categorizing simple maneuvers, we reveal that larva–larva interactions primarily occurred for escape responses. These series of escapes occurred after direct collisions (in one third of the cases) or via long distance interaction (two third of cases). Blind *atoh7^{-/-}* larvae showed a similar profile of interactions for escapes (data not shown); these interactions were most likely mechanically triggered.

Large-scale chemical and genetic screens would benefit from a quantitative approach to analyze fine locomotor patterns over long periods of time. Compared to other genetic models, zebrafish locomotion is difficult to analyze because larvae initiate maneuvers intermittently and during these short events, the larvae swim at a high speed with TBFs ranging from 15–100 Hz. The quantitative analysis of motor behavior for large-scale screens requires solving the problem of recording multiple animals simultaneously at high frequency (above 200 Hz) and for long periods of time (minutes). Here we implemented a reliable method for quantifying global parameters of movements based on stream-to-disk recordings acquired at high frequency and over long periods of time, limited only by data storage. Next we developed a robust method for tracking the full body position of zebrafish larvae swimming in groups. We first manually validated that the tracking accurately detected discrete movements, and then used the global parameters obtained to characterize the locomotion of WT larvae. Quantification of the global parameters describing larval movements corroborates previous observations based on fewer samples (Budick and O'Malley, 2000; Danos and Lauder, 2007; Liu et al., 2012). Similar estimates of the duration of movements, distance traveled and speed were obtained from the recent application of C-trax (designed originally for *Drosophila*) to zebrafish larvae [Lambert et al. (2012) based on Branson et al. (2009)]. In these conditions, recordings at low frequency over long periods of time, typically 60 Hz for minutes or hours, revealed the global level of activity over time but no information on fine kinematics during individual maneuvers (Elbaz et al., 2012). When recordings were performed at high frequency to capture the dynamics of motion, they usually lasted 1000 ms (Burgess and Granato, 2007).

We illustrated the benefit of ZebraZoom to quantify global parameters of movements by analyzing the effect of a drug to block glycinergic neurotransmission, which has been known to be involved in motor pattern generation and alternation between the left and right side of the spinal cord across vertebrate species (Grillner, 2003; Korn and Faber, 2005; Nishimaru and Kakizaki, 2009). Most studies relied on ventral nerve root recordings where muscles were dissected out or paralyzed in order to record the activity of motor neurons at the level of a few segments at most. Our automated quantification of locomotor events enabled

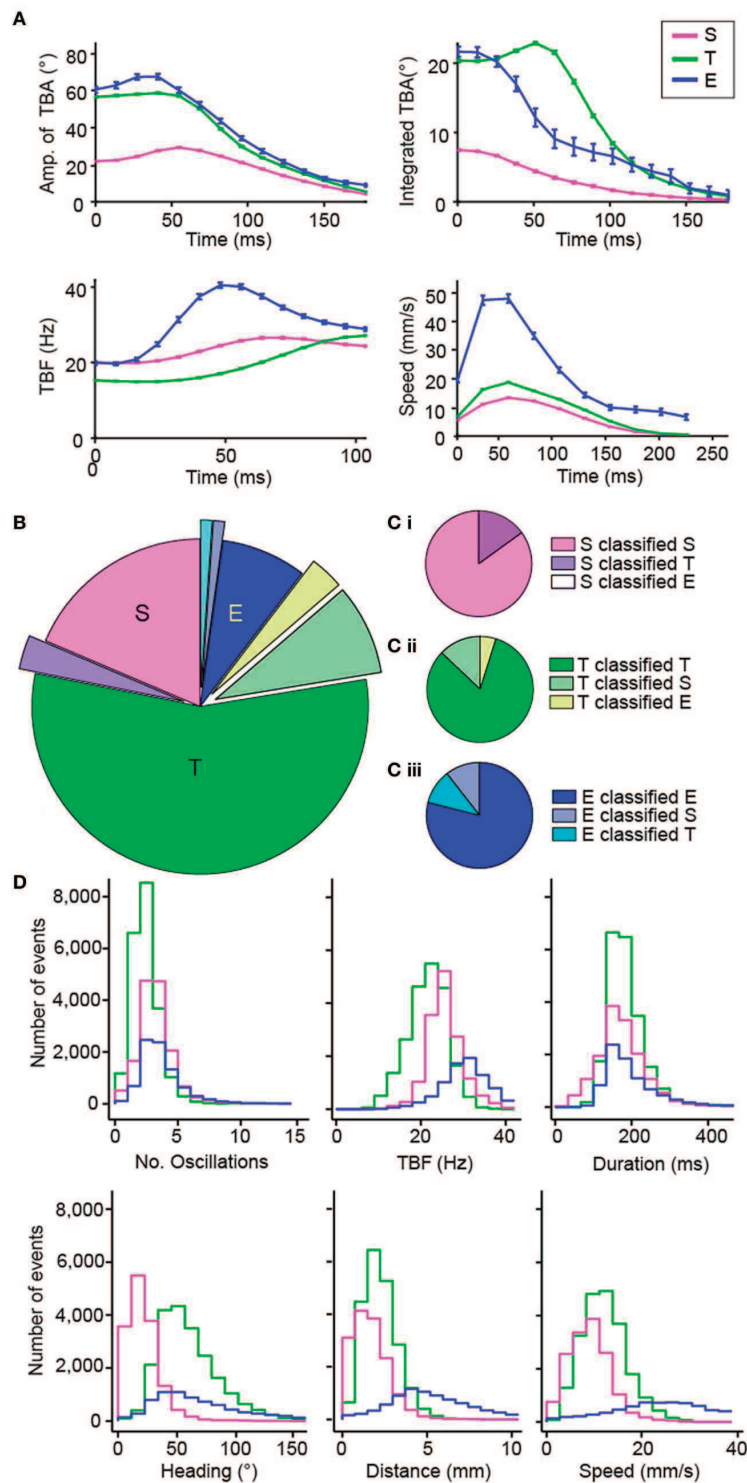


FIGURE 4 | Validation of the automated categorization of maneuvers: slow forward swim (S), routine turn (T) and escape (E). (A) Dynamic parameters used for categorizing the different maneuvers: amplitude of tail-bending angle (TBA) in degrees, integrated TBA in degrees, TBF in Hz, and speed in mm/s. The mean of each parameter for each time bin is shown and error bars are standard error of the mean: S in pink, T in green and E in blue. Time 0 is taken at the peak of the first bend of the movement. (B,C) Comparison of the results of the automatic categorization from

ZebraZoom with the subjective categorization by a trained experimenter on 189 movements from one video. The comparison of the categorization is shown overall (B) and for each maneuver (C: Ci for S, Cii for T, Ciii for E). The proportion of movements categorized the same way by both methods is shown in addition to the proportion of movements miscategorized and how they were categorized. (D) Distribution of global parameters for each maneuver S, T, and E of WT larvae (same color code as in A; 44,688 movements total from eight videos, six clutches).

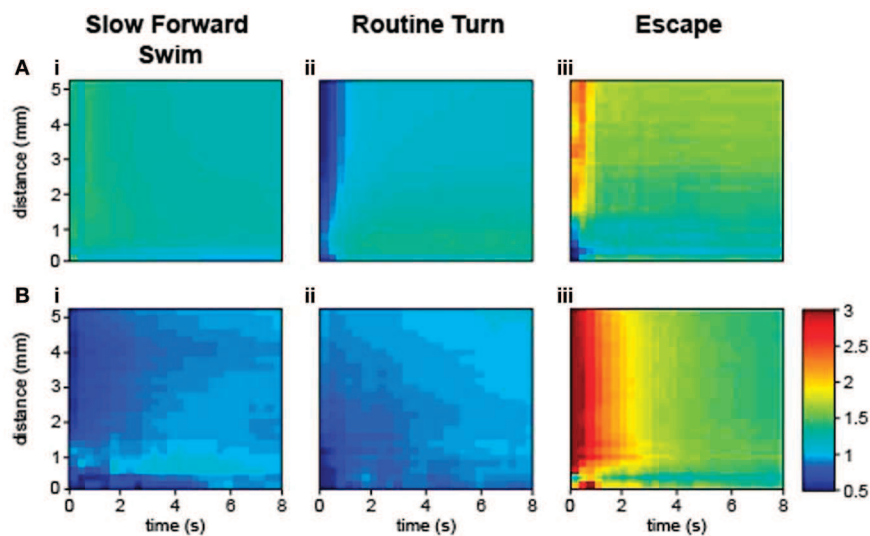


FIGURE 5 | Larva-larva interactions occurred most frequently as sequences of escapes. Transition index for the same larvae (A) and for different larvae (B). Time is plotted in seconds from the time of initiation of the first movement. Distance is plotted from the core

position of the larva at the beginning of a movement. (Ai,Bi) The sequence S-S. (Aii,Bii) The sequence T-T. (Aiii,Biii) The sequence E-E (36,068 total movements from five videos, 280 WT larvae, four clutches, 5–6 dpf).

Table 2 | Transition index for sequence of two maneuvers estimated as the probability of transition from maneuver 1 to maneuver 2 divided by the occurrence of the maneuver 2.

	S	T	E
INTERACTIONS BETWEEN DIFFERENT ANIMALS			
S	1.0498	1.0152	0.8481
T	1.0087	1.0413	0.8606
E	0.8549	0.8493	1.7528
REPETITIONS WITHIN THE SAME ANIMAL			
S	1.2162	0.8947	0.8413
T	0.9091	1.1185	0.8499
E	0.8263	0.8887	1.6995

identification of effects induced by bath application of the glycinergic antagonist strychnine on locomotion in intact animals. As predicted, bath application of strychnine dramatically reduced the occurrence of movements and the number of oscillations per movement, that was correlated with a reduction of the duration of movement and of the distance traveled. While mean TBF was not affected, we observed a reduction in the heading direction range and in speed. Our approach pinpointed effects of glycinergic blockade, including a reduction in the number of oscillations per movement, a kinematic feature not estimated in commercially available software. The analysis of the mutant *atoh7* revealed that although TBF and speed were not affected in the blind mutant, there was a small but significant decrease in the number of oscillations, heading direction range, distance, and duration of each bout compared to their control siblings. These effects were systematically observed on four clutches suggesting that visual feedback may impact some global parameters of locomotion. However since the pattern of expression of *atoh7* has not

yet been fully characterized, it cannot be excluded that the gene may be expressed in cells other than retinal ganglion cells.

The originality of ZebraZoom lies in categorizing all maneuvers performed by individual larvae in a group. The subjective analysis of maneuvers based on four independent experimenters revealed that locomotor maneuvers were not obvious to categorize. Based on subjective estimates, 18% of all movements corresponded to ambiguous maneuvers. By using a machine-learning paradigm, we trained ZebraZoom to categorize all maneuvers over tens of thousands of movements with 82.5% accuracy, a similar value to the 72% agreement rate of all four experimenters measured over a few hundreds of movements. The approach we developed here could be expanded to include directionality of the turns, sequences of maneuvers such as those occurring during prey tracking, and subcategories of escapes.

This study constitutes an important first step for accurate tracking of multiple larvae in groups over long periods of time and for categorizing maneuvers. Some improvements could be implemented in the future. While our tracking method currently relies on a simple “blob” approach solely based on raw image analysis, a model-based approach may be more reliable in particular when animals are in close contact (Fontaine et al., 2008). We show here that ZebraZoom can achieve an accurate categorization of maneuvers, comparable to experimenters’ estimates, based solely on the dynamics of movement of head and tail. An interesting avenue of exploration to address this could be investigation of novel dynamic parameters for the learning and recognition process of the classifier to yield subtler methods for detection of defects. Quantification of motor patterns in *C. elegans* is based on a description of all possible positions of the animal over time (Stephens et al., 2008). In order to fully understand larval zebrafish behavior we need to identify a minimal set of parameters sufficient to describe all motor patterns. All together this

work brings new insight to the complexity of behavior determination in zebrafish larvae and could be applied to investigation of the mechanisms of addiction, arousal, feeding, social interaction and aggression in larvae and juveniles (Gahtan et al., 2005; Bianco et al., 2011; Buske and Gerlai, 2011; Miller and Gerlai, 2012; Ziv et al., 2013). The observation of complex interactions in juveniles raises the hope that it will soon be possible to investigate the neuronal circuits and molecular pathways underlying social interactions. The fact that we can track individual larva and analyze their interactions is a major advance over existing methods. Our approach that systematically quantifies and categorizes thousands of motor patterns was designed to bring efficiency and reliability to drug screening and forward genetic screens. ZebraZoom can detect, quantify, and categorize movements to provide a quantitative description of global parameters as well as a qualitative description of all maneuvers performed by individual larvae.

METHODS

ZEBRAFISH HUSBANDRY

All experiments were performed on *Danio rerio* larvae between 5 and 7 dpf. AB and TL strains of WT larvae were obtained from our laboratory stock of adults. Embryos and larvae were raised in an incubator at 28.5°C under a 14/10 light/dark cycle (lights on, 8:00 A.M.; lights off, 10:00 P.M.) until the start of behavioral recordings. The mutant line for *atoh7* (Kay et al., 2001) was given by Dr. Herwig Baier, MPI Munich. Double recessive *atoh7*^{-/-} mutants were identified at 5 dpf by their dark pigmentation. All procedures were approved by the Institutional Ethics Committee at the Research Center of the Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (CRICM).

BEHAVIORAL RECORDINGS

Motor behavior of 56 larvae split into eight dishes (seven larvae per dish, **Figure 1Ai**) on a homogeneous illumination plate (light intensity 0.78 mW/cm², Phlox, ref. LEDW-BL-200/200-LLUB-Q-1R24) in egg water (http://zfin.org/zf_info/zfbook/chapt1/1.3.html, methylene blue added at 0.5 ppm). Following acclimation, larvae were recorded for 4 min at 337 Hz with a high-speed camera (VC-2MC-M340E0-C, CMOS chip 2048 × 1088 pixels, Vieworks, South Korea) placed above the setup and coupled to a camera objective (AF Nikkor 50 mm f/1.8D, Nikon, Japan). Pixel size was 66 μm. We developed a direct-to-disk high-speed imaging system designed for long acquisitions of raw images in collaboration with R&D Vision, France. Behavioral recordings were performed between 2:00 and 5:00 P.M. Larvae were acclimated for 60 minutes on the light source at room temperature (21–22°C) and kept at room temperature during all recordings. Larvae were kept in dishes with an inner diameter of 2.2 cm and an outer diameter of 3.5 cm (**Figure 1A**). Water was kept at a low level (2 mm) in order to reduce the occurrence of crossings between larvae. Typically 500–1000 movements were recorded in each 4-min session for each well.

ZEBRAZOOM TRACKING ALGORITHM

The first step is to track the core and then the tail for all larvae over time. Written in C++ using the *openCV* library, the

program identified the center position and heading direction of each larva (**Figures 1Ai–vi**). The algorithm used a Hough transform to identify the eight wells. For each well the background was estimated as the maximum pixel value over all frames of the video recording (**Figure 1Aii**) and then subtracted for all frames for that well (**Figure 1Aiii**). The resulting image was converted to binary (**Figure 1Aiv**). An erosion filter was applied twice in a row with a 3 by 3 structuring element (**Figure 1Av**). The “core” of the larva referred to the resulting connected components that had an appropriate area (between 0.0871 and 0.8712 mm²). The core of the larva included the head and the trunk with swim bladder (**Figure 1Avi**). The algorithm identified the head center position as the center of mass of the putative cores for each larva in a frame. To follow each larva across subsequent frames, ZebraZoom used the information from the previous two frames (core position and speed) to predict the position of the larva and located the closest core out of all the possible cores. The heading direction for each larva was calculated simultaneously using the moments of the eroded body (up to the second order, see red lines in **Figure 1Avi**).

For each larva with an identified core, we determined the “full body” referring to the connected component of the binary image in **Figure 1Aiv**. In order to track the tail, the full body was rotated so that the head axis was parallel to the *y*-axis, always in the same orientation. To identify the contour of the tail in the coordinate system defined by the head axis, a series of points was extracted from the full body by using the algorithm of Suzuki and Abe (1985), (white dots in **Figures 1Bi–iii**). Reference point A1 was the closest point on the contour line from the head center and reference point A2 was the point symmetrical along the head axis to reference point A1 on the contour. In order to identify the tip of the tail, four candidate points on the contour were selected with minimal and maximal *x*- and *y*-values (**Figures 1Bi–iii**). For the maximal *y*-value the point also had to be above a given distance away from the two reference points [below a 20% threshold for the ratio $|(d_1 - d_2)/(d_1 + d_2)|$, **Figure 1Bii**]. Distances *d*₁ and *d*₂ were calculated from each candidate point to the reference points A1 and A2 along the contour (**Figure 1Bii**). Candidate points with a ratio $|(d_1 - d_2)/(d_1 + d_2)|$ over 0.25 were excluded. The tip of the tail was then identified as the point associated with the smallest scalar product of the tangential vectors pointing in opposite directions (**Figure 1Biii**). The midline of the larva was defined as the line equidistant to the contour line on the left and right side.

ERRORS IN CORE AND TAIL TRACKING

If an error occurred in the core tracking, the larva was missing for that frame and there was no tracking of its tail. If the core of a larva was identified, the algorithm proceeded to the tail tracking. To confirm that the tail tracking was correct, the algorithm checked that the tail length was greater than 1.32 and less than 3.96 mm. If this criterion was invalid, the tail position was set to the previous frame. This happened in 13.46% of frames on average but was compensated by a smoothing spline on the center positions between the left and right contour points of the tail and a median filter applied on the tail-bending angle over time. The tail-bending angle was defined as the angle between the axis formed by the tip of the tail and the center of the head with respect to the larva heading direction (**Figures 1C,D**).

SEPARATING LARVAE DURING CONTACTS

Tracking was optimized to separate larvae in close vicinity to one another or in direct contact. For core tracking, if the trajectories of the two cores merged at a given time point, then the algorithm considered that a collision occurred between the two larvae. When the predicted positions of two larvae based on core position and speed in the two previous frames were closest to the same core, the algorithm considered that a collision between the two larvae occurred at that frame. When a collision was detected, the algorithm applied erosion filters in the region of interest defined by the core until more than one isolated core emerged. In rare cases, the multiple cores were not resolved and the larva could not be tracked for that frame. For the tail tracking, if the area of the larva's full body was greater than 1.9 mm^2 , the algorithm considered that two larvae were in direct contact. The distance separating the larvae's cores determined which of two algorithms was used to isolate the tails: if the distance was less than 1.32 mm, a line separation algorithm was applied. A line was created to separate the two larvae by optimizing the area of the resulting tails, calculated by maximizing the sum of the two largest areas containing a head center position. If the distance was greater than 1.32 mm, a pixel intensity separation algorithm was applied instead. The threshold used to convert the image into binary was adjusted until two separate full bodies, each a connected component, emerged and contained the head center position. Larvae crossings occurred once every 145 s on average per larva (0.0069 ± 0.0019 events per second) and the switching of identification between two larvae after a collision was estimated manually to occur every 109 s on average (0.0092 ± 0.0036 events per second per larva based on 720 s of recordings from four videos, and 28 larvae).

DETECTION OF MOVEMENTS

Algorithms for the detection of movements and the behavior analysis were written in MATLAB (The Mathworks, Inc., USA). The detection of movement was based solely on thresholding the tail-bending angle measured over time (Figures 1C,D). ZebraZoom detected the start of a movement when the value for the tail-bending angle at a given frame varied over 1.15° from the mean value of the tail-bending angle for the ten surrounding frames, or 29.7 ms. To avoid separating single maneuvers into multiple events, movements that occur within 14.8 ms of each other were merged. To avoid false positives we considered only movements in which the larva core had moved more than 0.099 mm and where the range of tail-bending angle values was above 2.86 degrees. Additionally, only events during which the eroded binary image of the larva had moved more than a set number of pixels between subsequent images were considered based on the parameters used for the erosion. Rarely we have observed two distinct movements occurring without a pause, such as a slow forward swim followed by an escape due to a collision. In these few cases when two movements occurred without a noticeable stabilization in the tail-bending angle over time, the movements were merged into one movement in our analysis.

Our tracking method was robust in these experimental conditions. We cannot probe the impact of a reduction of contrast or spatial resolution. All numerical thresholds used above for

tracking were fixed empirically, but they could easily be modified for other users to adapt to other recording conditions.

CALCULATION OF THE CURVATURE

After alignment of the body axis with the y-axis in a consistent orientation, the tail was represented parametrically in Cartesian coordinates as $[x(t), y(t)]$. The midline of the tail was fitted to the $x(t), y(t)$ function with a spline. Curvature was calculated in Cartesian coordinates:

$$c = \frac{|x'y'' - y'x''|}{(x'^2 + y'^2)^{\frac{3}{2}}}$$

where the derivatives were all calculated with respect to t , the distance along the tail.

EXTRACTION OF GLOBAL PARAMETERS

For all frames of a video, ZebraZoom outputs variables for each larva in each dish including: the position of its core, head axis, midline position of its tail and tail-bending angle. For each detected movement, a reference number for the larvae was extracted along with the corresponding well number, start and end time of the movement, and global parameters such as the number of oscillations, TBF, movement duration, heading direction range referring to the range of values of the heading axis for one movement with the heading angle reset to zero at the onset of movement, distance traveled, average speed (distance traveled divided by movement duration).

AUTOMATIC MULTICLASS CATEGORIZATION

We automatically attributed each movement detected in the video to either one of the three maneuvers: slow forward swim, routine turn or escape response. Our method relied on a dynamic set of parameters extracted from the bending angle of the tail estimated from the first tail bend over a limited time window (Figures 1C, 4A). We based our categorization on the four following parameters: (1) the amplitude of the tail-bending angle (0–178 ms, bins of 12 ms), (2) the instantaneous frequency (0–104 ms, bins of 7 ms), (3) the cumulative tail-bending angle calculated as the average angle value over time (0–178 ms, bins of 12 ms), and (4) the speed (0–240 ms, bins of 24 ms) (Figure 4A). The values of these four dynamic parameters were interpolated with a spline for a given time window during the movement and then used for categorization of every movement. PCA was first performed to reduce noise and dimensionality. Each movement was subsequently represented by the fourteen first principal components of the PCA out of 53 components (representing all together about 93% of the variance), to which the total duration of the movement was added. Multiclass categorization was implemented in two steps: a series of two subsequent SVM classifiers with linear kernel was applied for automatic categorization of movements: the first SVM classifier discriminated slow forward swims vs. turns and escapes, and if necessary a second SVM discriminated between a routine turn and an escape. We used two distinct datasets from WT 5–7 dpf larvae, one for learning the three maneuver types (five videos, $n = 201$ movements) and one for testing their recognition (three videos, $n = 189$ movements).

ESTIMATING THE RECURRENCE OF MANEUVERS

Successions of maneuvers performed by larvae in a given dish were modeled as Markov chains. Out of the nine possible sequences of two maneuvers (S–S, S–T, S–E, T–S, T–T, T–E, E–S, E–T, E–E), we estimated the frequency of occurrence of each sequence. For a given movement classified as S, T, or E occurring at a given time in one dish, we calculated the transition probability for the subsequent movement to be classified as S, T, or E. We calculated a weighted transition index (I) for each sequence of two sequential maneuvers as the ratio of the transition probability from the first maneuver to the second, divided by the probability of occurrence of the second maneuver (Table 2 for values of all transition indexes). When I is equal to 1, the probability of repeating a maneuver is equal to the probability of random occurrence of the maneuver (probability of random occurrence was 0.35 for S; 0.48 for T and 0.16 for E; Table 2). Thus the index of recurrence I was defined as:

$$I(B1, B2) = \frac{p(x_i = B1 | x_{i-1} = B2)}{p(x_i = B1)}$$

with $B1$ and $B2$ as two possible maneuvers (S, T, or E) and x_{i-1} and x_i as two successive movements. WT larvae were used to estimate the transition index (36,068 movements from 280 larvae originating from four clutches and obtained from 40 wells). To investigate the recurrence of maneuvers as a function of time and distance, we calculated I as a function of the distance separating the two head centers of the larvae at the onset of their respective movement and the time as the time interval between the onsets of the first and second movement. I was calculated for many different time and distance windows. In Figure 5, we plotted these indexes for the sequences S–S, T–T, and E–E. We first calculated the index for the same larva (Figures 5Ai–iii) and across different larvae (Figures 5Bi–iii).

STATISTICAL ANALYSIS

The data used for Figure 2A were based on eight videos, 420 WT AB larvae from six different clutches between 5 and 7 dpf. All values were given as mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) calculated per movement. For the pharmacology experiments (Figure 2B), strychnine was bath applied at 75 μ M and the data were based on two videos of 84 WT larvae coming from two clutches (42 for controls and 42 for strychnine) between 6 and 7 dpf. The data on *atoh7*^{-/-} mutants in Figure 2C were generated using four videos, 224 larvae total originating from four clutches (112 *atoh7*^{-/-} and 112 control siblings). All global parameters plotted in Figures 2B,C were calculated per larva then averaged across all larvae and means were given \pm s.e.m. across all larvae. Since the distributions of global parameters were not normal, a standard non-parametric Wilcoxon rank sum test was used in MATLAB for calculating differences between conditions with vs. without drugs for Figure 2B and *atoh7*^{-/-} vs. siblings for Figure 2C. The data used for Figure 4D were based on 44,688 movements from eight videos, 448 larvae, six clutches and for Figure 5 from 36,068 movements from five videos, 280 WT AB larvae from four clutches. To test how the maximal values of the transition index were different from random, we calculated

I_{\max} after randomly permuting maneuvers while keeping track of the larva identity, time, and location the same for 50 iterations. For each comparison, S–S, T–T, E–E across different larvae or within the same larva, we compared the values of I_{\max} after randomization to the measured value I_{\max} using a two-sample T -test.

DATA AND ALGORITHM SHARING

The software ZebraZoom is documented and available online from Source Forge in the code tab (<http://sourceforge.net/p/zebrazoom/wiki/Home/>). ZebraZoom requires MATLAB and works reliably on an Ubuntu 11.04 computer with OpenCV installed and MATLAB 7.10.

CONTRIBUTIONS

Claire Wyart and Olivier Mirat designed the project with help from Jenna R. Sternberg. Olivier Mirat wrote all algorithms of the ZebraZoom program. Jenna R. Sternberg and Claire Wyart assembled the experimental setup. Jenna R. Sternberg performed all experiments. Olivier Mirat and Claire Wyart analyzed the data. Kristen E. Severi, Olivier Mirat, and Claire Wyart prepared the figures. All authors tested and validated the program and wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Stanley Durlleman, Dr. Lionel Moisan, Dr. Carlos Pantoja, and Claire Oldfield for critical reading of the manuscript. We thank Dr. Olivier Colliot, and Drs. Stanley Durlleman and Lionel Moisan again for advice on machine learning, tracking, and Markov chain analysis. We thank Caroline Vidal, Philippe Domineaux, and Antoine Mongay for data server access. We thank Laura Garnero, Audrey Baradel, Lydia Djenoune, Victor Adenis, Devika Nair, and Maxime Gaudin for technical assistance and fish care. We thank Dr. Herwig Baier for kindly sharing the *atoh7* mutant line. This work received critical support from the Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (ICM/CR), the Ecole des Neurosciences de Paris (ENP), the Fondation Bettencourt Schueller, Mr. Pierre Belle, the City of Paris Emergence program, the ATIP-AVENIR program from INSERM and CNRS, the Fyssen Foundation, the International Reintegration Grant from Marie Curie Actions Framework Program 6, and the European Research Council (ERC) starter grant “OptoLoco.” Jenna R. Sternberg is affiliated with the graduate program of the Ecole des Neurosciences de Paris (ENP) associated with the ED3C. Olivier Mirat is funded by a DIGITEO PhD fellowship associated with the Ecole Doctorale Interdisciplinaire Européenne Frontières du vivant ED474 program doctoral Bettencourt.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: http://www.frontiersin.org/Neural_Circuits/10.3389/fncir.2013.00107/abstract

Video S1 | ZebraZoom tracking of seven larvae in a dish. Acquisition was performed at 300 Hz, and one out of every ten images is displayed (every 33.3 ms).

REFERENCES

- Appelbaum, L., Wang, G. X., Maro, G. S., Mori, R., Tovin, A., Marin, W., et al. (2009). Sleep-wake regulation and hypocretin-melatonin interaction in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21942–21947. doi: 10.1073/pnas.906637106
- Bianco, I. H., Kampff, A. R., and Engert, F. (2011). Prey capture behavior evoked by simple visual stimuli in larval zebrafish. *Front. Syst. Neurosci.* 5:101. doi: 10.3389/fnsys.2011.00101
- Blaser, R. E., Chadwick, L., and McGinnis, G. C. (2010). Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 208, 56–62. doi: 10.1016/j.bbr.2009.11.009
- Borla, M. A., Palecek, B., Budick, S., and O'Malley, D. M. (2002). Prey capture by larval zebrafish: evidence for fine axial motor control. *Brain Behav. Evol.* 60, 207–229. doi: 10.1159/000066699
- Branson, K., Robie, A. A., Bender, J., Perona, P., and Dickinson, M. H. (2009). High-throughput ethomics in large groups of *Drosophila*. *Nat. Methods* 6, 451–457. doi: 10.1038/nmeth.1328
- Budick, S. A., and O'Malley, D. M. (2000). Locomotor repertoire of the larval zebrafish: swimming, turning and prey capture. *J. Exp. Biol.* 203(Pt 17), 2565–2579.
- Burgess, H. A., and Granato, M. (2007). Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. *J. Exp. Biol.* 210(Pt 14), 2526–2539. doi: 10.1242/jeb.003939
- Buske, C., and Gerlai, R. (2011). Shoaling develops with age in zebrafish (*Danio rerio*). *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 409–415. doi: 10.1016/j.pnpb.2010.09.003
- Cachat, J., Stewart, A., Utterback, E., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., et al. (2011). Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PLoS ONE* 6:e17597. doi: 10.1371/journal.pone.0017597
- Chalfie, M., Sulston, J. E., White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., and Brenner, S. (1985). The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 5, 956–964.
- Dale, N. (1985). Reciprocal inhibitory interneurons in the *Xenopus* embryo spinal cord. *J. Physiol.* 363, 61–70.
- Dankert, H., Wang, L., Hoopfer, E. D., Anderson, D. J., and Perona, P. (2009). Automated monitoring and analysis of social behavior in *Drosophila*. *Nat. Methods* 6, 297–303. doi: 10.1038/nmeth.1310
- Danos, N., and Lauder, G. V. (2007). The ontogeny of fin function during routine turns in zebrafish *Danio rerio*. *J. Exp. Biol.* 210(Pt 19), 3374–3386. doi: 10.1242/jeb.007484
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDermid, J. R., and Brustein, E. (2002). Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog. Neurobiol.* 68, 85–111. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00075-8
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., et al. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123, 37–46.
- Elbaz, I., Yelin-Bekerman, L., Nicenboim, J., Vatine, G., and Appelbaum, L. (2012). Genetic ablation of hypocretin neurons alters behavioral state transitions in zebrafish. *J. Neurosci.* 32, 12961–12972. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1284-12.2012
- Fontaine, E., Lentink, D., Kranenbarg, S., Müller, U. K., van Leeuwen, J. L., Barr, A. H., et al. (2008). Automated visual tracking for studying the ontogeny of zebrafish swimming. *J. Exp. Biol.* 211(Pt 8), 1305–1316. doi: 10.1242/jeb.010272
- Gahtan, E., Tanger, P., and Baier, H. (2005). Visual prey capture in larval zebrafish is controlled by identified reticulospinal neurons downstream of the tectum. *J. Neurosci.* 25, 9294–9303. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2678-05.2005
- Gautrais, J., Ginelli, F., Fournier, R., Blanco, S., Soria, M., Chaté H., et al. (2012). Deciphering interactions in moving animal groups. *PLoS Comput. Biol.* 8:e1002678. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002678
- Granato, M., van Eeden, F. J., Schach, U., Trowe, T., Brand, M., Furutani-Seiki, M., et al. (1996). Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development* 123, 399–413.
- Grillner, S. (2003). The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 573–586. doi: 10.1038/nrn1137
- Grillner, S., Deliagina, T., Ekeberg, O., el Manira, A., Hill, R. H., Lansner, A., et al. (1995). Neural networks that co-ordinate locomotion and body orientation in lamprey. *Trends Neurosci.* 18, 270–279. doi: 10.1016/0166-2236(95)80008-P
- Haffter, P., and Nusslein-Volhard, C. (1996). Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 221–227.
- Hirata, H., Saint-Amant, L., Downes, G. B., Cui, W. W., Zhou, W., Granato, M., et al. (2005). Zebrafish bandoneon mutants display behavioral defects due to a mutation in the glycine receptor beta-subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8345–8350. doi: 10.1073/pnas.0500862102
- Kabra, M., Robie, A. A., Rivera-Alba, M., Branson, S., and Branson, K. (2013). JAABA: interactive machine learning for automatic annotation of animal behavior. *Nat. Methods* 10, 64–67. doi: 10.1038/nmeth.2281
- Katz, Y., Tunström, K., Ioannou, C. C., Huepe, C., and Couzin, I. D. (2011). Inferring the structure and dynamics of interactions in schooling fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18720–18725. doi: 10.1073/pnas.1107583108
- Kay, J. N., Finger-Baier, K. C., Roeser, T., Staub, W., and Baier, H. (2001). Retinal ganglion cell genesis requires lakritz, a Zebrafish atonal Homolog. *Neuron* 30, 725–736.
- Khor, B. S., Jamil, M. F., Adenan, M. I., and Shu-Chien, A. C. (2011). Mitragnine attenuates withdrawal syndrome in morphine-withdrawn zebrafish. *PLoS ONE* 6:e28340. doi: 10.1371/journal.pone.0028340
- Korn, H., and Faber, D. S. (2005). The Mauthner cell half a century later: a neurobiological model for decision-making? *Neuron* 47, 13–28. doi: 10.1016/j.neuron.2005.05.019
- Lambert, A. M., Bonkowsky, J. L., and Masino, M. A. (2012). The conserved dopaminergic diencephalospinal tract mediates vertebrate locomotor development in zebrafish larvae. *J. Neurosci.* 32, 13488–13500. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1638-12.2012
- Lee, A., Mathuru, A. S., Teh, C., Kibat, C., Korzh, V., Penney, T. B., et al. (2010). The habenula prevents helpless behavior in larval zebrafish. *Curr. Biol.* 20, 2211–2216. doi: 10.1016/j.cub.2010.11.025
- Li, W. C., Higashijima, S., Parry, D. M., Roberts, A., and Soffe, S. R. (2004). Primitive roles for inhibitory interneurons in developing frog spinal cord. *J. Neurosci.* 24, 5840–5848. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1633-04.2004
- Liu, Y. C., Bailey, I., and Hale, M. E. (2012). Alternative startle motor patterns and behaviors in the larval zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 198, 11–24. doi: 10.1007/s00359-011-0682-1
- Masino, M. A., and Fetcho, J. R. (2005). Fictive swimming motor patterns in wild type and mutant larval zebrafish. *J. Neurophysiol.* 93, 3177–3188. doi: 10.1152/jn.01248.2004
- McElligott, M. B., and O'Malley, D. M. (2005). Prey tracking by larval zebrafish: axial kinematics and visual control. *Brain Behav. Evol.* 66, 177–196. doi: 10.1159/000087158
- Miller, N., and Gerlai, R. (2012). From schooling to shoaling: patterns of collective motion in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS ONE* 7:e48865. doi: 10.1371/journal.pone.0048865
- Moore, M. S., DeZazzo, J., Luk, A. Y., Tully, T., Singh, C. M., and Heberlein, U. (1998). Ethanol intoxication in *Drosophila*: genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signaling pathway. *Cell* 93, 997–1007. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81205-2
- Nishimaru, H., and Kakizaki, M. (2009). The role of inhibitory neurotransmission in locomotor circuits of the developing mammalian spinal cord. *Acta Physiol. (Oxf.)* 197, 83–97. doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.02020.x
- Odenthal, J., Rossnagel, K., Haffter, P., Kelsh, R. N., Vogelsang, E., Brand, M., et al. (1996). Mutations affecting xanthophore pigmentation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 391–398.
- Petzold, A. M., Balciunas, D., Sivasubbu, S., Clark, K. J., Bedell, V. M., Westcot, S. E., et al. (2009). Nicotine response genetics in the zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18662–18667. doi: 10.1073/pnas.0908247106
- Rihel, J., Prober, D. A., Arvanites, A., Lam, K., Zimmerman, S., Jang, S., et al. (2010). Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science* 327, 348–351. doi: 10.1126/science.1183090
- Rihel, J., and Schier, A. F. (2012). Behavioral screening for neuroactive drugs in zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 373–385. doi: 10.1002/dneu.20910
- Scholz, H., Ramond, J., Singh, C. M., and Heberlein, U. (2000). Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron* 28, 261–271.
- Stephens, G. J., Johnson-Kerner, B., Bialek, W., and Ryu, W. S. (2008). Dimensionality and dynamics in the behavior of *C. elegans*. *PLoS Comput. Biol.* 4:e1000028. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000028
- Suzuki, S., and Abre, K. (1985). Topological structural analysis of

- digital binary image by border following. *Comput. Vis. Graph. Image Process.* 30, 32–46.
- Swierczek, N. A., Giles, A. C., Rankin, C. H., and Kerr, R. A. (2011). High-throughput behavioral analysis in *C. elegans*. *Nat. Methods* 8, 592–598. doi: 10.1038/nmeth.1625
- Vermoesen, K., Serruys, A. S., Loyens, E., Afrikanova, T., Massie, A., Schallier, A., et al. (2011). Assessment of the convulsant liability of antidepressants using zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy Behav.* 22, 450–460. doi: 10.1016/j.yebeh.2011.08.016
- Zakhary, S. M., Ayubcha, D., Ansari, F., Kamran, K., Karim, M., Leheste, J. R., et al. (2011). A behavioral and molecular analysis of ketamine in zebrafish. *Synapse* 65, 160–167. doi: 10.1002/syn.20830
- Zhdanova, I. V., Wang, S. Y., Leclair, O. U., and Danilova, N. P. (2001). Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res.* 903, 263–268. doi: 10.1016/S0006-8993(01)02444-1
- Ziv, L., Muto, A., Schoonheim, P. J., Meijsing, S. H., Strasser, D., Ingraham, H. A., et al. (2013). An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor. *Mol. Psychiatry* 18, 681–691. doi: 10.1038/mp.2012.64
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Received: 28 February 2013; accepted: 21 May 2013; published online: 12 June 2013.
- Citation: Mirat O, Sternberg JR, Severi KE and Wyart C (2013) *ZebraZoom: an automated program for high-throughput behavioral analysis and categorization.* *Front. Neural Circuits* 7:107. doi: 10.3389/fncir.2013.00107
- Copyright © 2013 Mirat, Sternberg, Severi and Wyart. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

Bibliographie

- Adams, M. D. 2000. "The Genome Sequence of *Drosophila Melanogaster*." *Science* 287 (5461) (March 24): 2185–2195.
- Ahrens, Misha B., Kuo Hua Huang, Sujatha Narayan, Brett D. Mensh, and Florian Engert. 2013. "Two-photon Calcium Imaging During Fictive Navigation in Virtual Environments." *Frontiers in Neural Circuits* 7.
- Ahrens, Misha B., Jennifer M. Li, Michael B. Orger, Drew N. Robson, Alexander F. Schier, Florian Engert, and Ruben Portugues. 2012. "Brain-wide Neuronal Dynamics During Motor Adaptation in Zebrafish." *Nature* (May 9).
- Aizenberg, M., and E. M. Schuman. 2011. "Cerebellar-Dependent Learning in Larval Zebrafish." *Journal of Neuroscience* 31 (24) (June 15): 8708–8712.
- Appelbaum, Lior, Gordon X. Wang, Geraldine S. Maro, Rotem Mori, Adi Tovin, Wilfredo Marin, Tohei Yokogawa, Koichi Kawakami, Stephen J. Smith, and Yoav Gothilf. 2009. "Sleep–wake Regulation and Hypocretin–melatonin Interaction in Zebrafish." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (51): 21942–21947.
- Barreiro-Iglesias, Antón, Karolina Sandra Mysiak, Fátima Adrio, María Celina Rodicio, Catherina G. Becker, Thomas Becker, and Ramón Anadón. 2013. "Distribution of Glycinergic Neurons in the Brain of Glycine Transporter-2 Transgenic Tg(*glyt2:Gfp*) Adult Zebrafish: Relationship to Brain-spinal Descending Systems." *Journal of Comparative Neurology* 521 (2) (February 1): 389–425.
- Beyan, Cigdem, and Robert B. Fisher. 2012. "A Filtering Mechanism for Normal Fish Trajectories." In *Pattern Recognition (ICPR), 2012 21st International Conference On*, 2286–2289.
- Bianco, Isaac H., Adam R. Kampff, and Florian Engert. 2011. "Prey Capture Behavior Evoked by Simple Visual Stimuli in Larval Zebrafish." *Frontiers in Systems Neuroscience* 5.
- Bill, Brent R., Andrew M. Petzold, Karl J. Clark, Lisa A. Schimmenti, and Stephen C. Ekker. 2009. "A Primer for Morpholino Use in Zebrafish." *Zebrafish* 6 (1): 69–77.
- Blaser, R.E., L. Chadwick, and G.C. McGinnis. 2010. "Behavioral Measures of Anxiety in Zebrafish (*Danio Rerio*)." *Behavioural Brain Research* 208 (1) (March): 56–62.
- Borla, Melissa A., Betsy Palecek, Seth Budick, and Donald M. O'Malley. 2002. "Prey Capture by Larval Zebrafish: Evidence for Fine Axial Motor Control." *Brain, Behavior and Evolution* 60 (4): 207–229.
- Boyden, Edward S., Feng Zhang, Ernst Bamberg, Georg Nagel, and Karl Deisseroth. 2005. "Millisecond-timescale, Genetically Targeted Optical Control of Neural Activity." *Nature Neuroscience* 8 (9): 1263–1268.
- Branson, Kristin, Alice A Robie, John Bender, Pietro Perona, and Michael H Dickinson. 2009. "High-throughput Ethomics in Large Groups of *Drosophila*." *Nature Methods* 6 (6) (May 3): 451–457.
- Brenner, Sydney. 1974. "The Genetics of *Caenorhabditis Elegans*." *Genetics* 77 (1): 71–94.
- Budick, SETH A., and DONALD M. O'Malley. 2000. "Locomotor Repertoire of the Larval Zebrafish: Swimming, Turning and Prey Capture." *Journal of Experimental Biology* 203 (17): 2565–2579.
- Burgess, H. A., and M. Granato. 2007. "Modulation of Locomotor Activity in Larval Zebrafish During Light Adaptation." *Journal of Experimental Biology* 210 (14) (July 15): 2526–2539.
- Buske, Christine, and Robert Gerlai. 2011. "Shoaling Develops with Age in Zebrafish (*Danio Rerio*)." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35 (6) (August): 1409–1415.
- Cachat, Jonathan, Adam Stewart, Eli Utterback, Peter Hart, Siddharth Gaikwad, Keith Wong, Evan Kyzar, Nadine Wu, and Allan V. Kalueff. 2011. "Three-Dimensional Neurophenotyping of

- Adult Zebrafish Behavior.” Edited by Alessandro Bartolomucci. *PLoS ONE* 6 (3) (March 7): e17597.
- Chinwalla, Asif T., Lisa L. Cook, Kimberly D. Delehaunty, Ginger A. Fewell, Lucinda A. Fulton, Robert S. Fulton, Tina A. Graves, LaDeana W. Hillier, Elaine R. Mardis, and John D. McPherson. 2002. “Initial Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome.” *Nature* 420 (6915): 520–562.
- Cristianini, N., and Shawe-Taylor, J. 2000. *An Introduction to Support Vector Machines and Other Kernel-based Learning Methods*. Cambridge University Press.
- Cuénot, Lucien. 1908. “L’hérédité de La Pigmentation Chez Les Souris.” *Molecular and General Genetics MGG* 1 (1): 129–129.
- Dale, N. 1985. “Reciprocal Inhibitory Interneurons in the *Xenopus* Embryo Spinal Cord.” *The Journal of Physiology* 363 (1): 61–70.
- Dankert, Heiko, Liming Wang, Eric D Hoopfer, David J Anderson, and Pietro Perona. 2009. “Automated Monitoring and Analysis of Social Behavior in *Drosophila*.” *Nature Methods* 6 (4) (March 8): 297–303.
- Deisseroth, Karl. 2010. “Optogenetics.” *Nature Methods* 8 (1) (December 20): 26–29.
- Del Bene, F., C. Wyart, E. Robles, A. Tran, L. Looger, E. K. Scott, E. Y. Isacoff, and H. Baier. 2010. “Filtering of Visual Information in the Tectum by an Identified Neural Circuit.” *Science* 330 (6004) (October 28): 669–673.
- Douglass, Adam D., Sebastian Kraves, Karl Deisseroth, Alexander F. Schier, and Florian Engert. 2008. “Escape Behavior Elicited by Single, Channelrhodopsin-2-Evoked Spikes in Zebrafish Somatosensory Neurons.” *Current Biology* 18 (15) (August): 1133–1137.
- Driever, W., L. Solnica-Krezel, A. F. Schier, S. C. Neuhauss, J. Malicki, D. L. Stemple, D. Y. Stainier, F. Zwartkuis, S. Abdelilah, and Z. Rangini. 1996. “A Genetic Screen for Mutations Affecting Embryogenesis in Zebrafish.” *Development* 123 (1): 37–46.
- Elbaz, I., L. Yelin-Bekerman, J. Nicenboim, G. Vatine, and L. Appelbaum. 2012. “Genetic Ablation of Hypocretin Neurons Alters Behavioral State Transitions in Zebrafish.” *Journal of Neuroscience* 32 (37) (September 12): 12961–12972.
- Fang-Yen, Christopher, Matthieu Wyart, Julie Xie, Risa Kawai, Tom Kodger, Sway Chen, Quan Wen, and Aravinthan DT Samuel. 2010. “Biomechanical Analysis of Gait Adaptation in the Nematode *Caenorhabditis Elegans*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (47): 20323–20328.
- Faure, Philippe, Heike Neumeister, Donald S. Faber, and Henri Korn. 2003. “Symbolic Analysis of Swimming Trajectories Reveals Scale Invariance and Provides a Model for Fish Locomotion.” *Fractals* 11 (03): 233–243.
- Fetcho, Joseph R., and Katharine S. Liu. 1998. “Zebrafish as a Model System for Studying Neuronal Circuits and Behavior.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 860 (1): 333–345.
- Fontaine, E., D. Lentink, S. Kranenbarg, U. K. Muller, J. L. van Leeuwen, A. H. Barr, and J. W. Burdick. 2008. “Automated Visual Tracking for Studying the Ontogeny of Zebrafish Swimming.” *Journal of Experimental Biology* 211 (8) (April 15): 1305–1316.
- Gahtan, E. 2005. “Visual Prey Capture in Larval Zebrafish Is Controlled by Identified Reticulospinal Neurons Downstream of the Tectum.” *Journal of Neuroscience* 25 (40) (October 5): 9294–9303.
- Golgi, Camillo. 1901. “The Neuron Doctrine: Theory and Facts.” *Nobel Lectures: Physiology or Medicine* 1921: 189–217.
- Granato, Michael, F. J. Van Eeden, Ursula Schach, Torsten Trowe, Michael Brand, Makoto Furutani-Seiki, Pascal Haffter, Matthias Hammerschmidt, Carl-Philipp Heisenberg, and Yun-Jin Jiang. 1996. “Genes Controlling and Mediating Locomotion Behavior of the Zebrafish Embryo and Larva.” *Development* 123 (1): 399–413.

- Griffiths, Brian B., Peter J. Schoonheim, Limor Ziv, Lisa Voelker, Herwig Baier, and Ethan Gahtan. 2012. "A Zebrafish Model of Glucocorticoid Resistance Shows Serotonergic Modulation of the Stress Response." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6.
- Grillner, S., T. Deliagina, A. El Manira, R. H. Hill, G. N. Orlovsky, P. Wallén, Ö Ekeberg, and A. Lansner. 1995. "Neural Networks That Co-ordinate Locomotion and Body Orientation in Lamprey." *Trends in Neurosciences* 18 (6): 270–279.
- Grillner, Sten, and Thomas M Jessell. 2009. "Measured Motion: Searching for Simplicity in Spinal Locomotor Networks." *Current Opinion in Neurobiology* 19 (6) (December): 572–586.
- Grillner, Sten, and Peter Wallen. 1985. "Central Pattern Generators for Locomotion, with Special Reference to Vertebrates." *Annual Review of Neuroscience* 8 (1): 233–261.
- Helder, Rémi, Didier Desor, and Anne-Marie Toniolo. 1995. "Potential Stock Differences in the Social Behavior of Rats in a Situation of Restricted Access to Food." *Behavior Genetics* 25 (5): 483–487.
- Higashijima, S.-i. 2003. "Imaging Neuronal Activity During Zebrafish Behavior With a Genetically Encoded Calcium Indicator." *Journal of Neurophysiology* 90 (6) (August 27): 3986–3997.
- Hirata, Hiromi, Louis Saint-Amant, Gerald B. Downes, Wilson W. Cui, Weibin Zhou, Michael Granato, and John Y. Kuwada. 2005. "Zebrafish Bandoneon Mutants Display Behavioral Defects Due to a Mutation in the Glycine Receptor B-subunit." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (23): 8345–8350.
- Howe, Kerstin, Matthew D. Clark, Carlos F. Torroja, James Torrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E. Collins, et al. 2013. "The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome." *Nature* 496 (7446) (April 17): 498–503.
- Huang, Peng, An Xiao, Mingguo Zhou, Zuoyan Zhu, Shuo Lin, and Bo Zhang. 2011. "Heritable Gene Targeting in Zebrafish Using Customized TALENs." *Nature Biotechnology* 29 (8): 699–700.
- Hwang, Woong Y, Yanfang Fu, Deepak Reyon, Morgan L Maeder, Shengdar Q Tsai, Jeffrey D Sander, Randall T Peterson, J-R Joanna Yeh, and J Keith Joung. 2013. "Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas System." *Nature Biotechnology* 31 (3) (January 29): 227–229.
- Kabra, Mayank, Alice A Robie, Marta Rivera-Alba, Steven Branson, and Kristin Branson. 2012. "JAABA: Interactive Machine Learning for Automatic Annotation of Animal Behavior." *Nature Methods* 10 (1) (December 2): 64–67.
- Kalueff, Allan V., Michael Gebhardt, Adam Michael Stewart, Jonathan M. Cachat, Mallorie Brimmer, Jonathan S. Chawla, Cassandra Craddock, et al. 2013. "Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond." *Zebrafish* 10 (1) (March): 70–86.
- Kandel, Eric R. 2001. "The Molecular Biology of Memory Storage: a Dialogue Between Genes and Synapses." *Science* 294 (5544): 1030–1038.
- Kawakami, Koichi. 2004. "Transgenesis and Gene Trap Methods in Zebrafish by Using the Tol2 Transposable Element." *Methods in Cell Biology* 77: 201–222.
- Kay, Jeremy N., Karin C. Finger-Baier, Tobias Roeser, Wendy Staub, and Herwig Baier. 2001. "Retinal Ganglion Cell Genesis Requires Lakritz, a Zebrafish Atonal Homolog." *Neuron* 30 (3): 725–736.
- Khor, Beng-Siang, Mohd Fadzly Amar Jamil, Mohamad Ilham Adenan, and Alexander Chong Shu-Chien. 2011. "Mitragynine Attenuates Withdrawal Syndrome in Morphine-Withdrawn Zebrafish." Edited by Ramani Ramchandran. *PLoS ONE* 6 (12) (December 21): e28340.
- Kimmel, Charles B., Robert C. Eaton, and Susan L. Powell. 1980. "Decreased Fast-start Performance of Zebrafish Larvae Lacking Mauthner Neurons." *Journal of Comparative Physiology* 140 (4): 343–350.
- Kimura, Yukiko, Chie Satou, Shunji Fujioka, Wataru Shoji, Keiko Umeda, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, and Shin-ichi Higashijima. 2013. "Hindbrain V2a Neurons in the Excitation of Spinal

- Locomotor Circuits During Zebrafish Swimming.” *Current Biology* 23 (10) (May): 843–849.
- Kohashi, T., and Y. Oda. 2008. “Initiation of Mauthner- or Non-Mauthner-Mediated Fast Escape Evoked by Different Modes of Sensory Input.” *Journal of Neuroscience* 28 (42) (October 15): 10641–10653.
- Kotsiantis, S. B., I. D. Zaharakis, and P. E. Pintelas. 2007. “Supervised Machine Learning: A Review of Classification Techniques.” *Frontiers in Artificial Intelligence and Applications* 160: 3.
- Lambert, A. M., J. L. Bonkowsky, and M. A. Masino. 2012. “The Conserved Dopaminergic Diencephalospinal Tract Mediates Vertebrate Locomotor Development in Zebrafish Larvae.” *Journal of Neuroscience* 32 (39) (September 26): 13488–13500.
- Lee, Aletheia, Ajay S. Mathuru, Cathleen Teh, Caroline Kibat, Vladimir Korzh, Trevor B. Penney, and Suresh Jesuthasan. 2010. “The Habenula Prevents Helpless Behavior in Larval Zebrafish.” *Current Biology* 20 (24) (December): 2211–2216.
- Leifer, Andrew M, Christopher Fang-Yen, Marc Gershow, Mark J Alkema, and Aravinthan D T Samuel. 2011. “Optogenetic Manipulation of Neural Activity in Freely Moving *Caenorhabditis Elegans*.” *Nature Methods* 8 (2) (January 16): 147–152.
- Li, W.-C. 2004. “Primitive Roles for Inhibitory Interneurons in Developing Frog Spinal Cord.” *Journal of Neuroscience* 24 (25) (June 23): 5840–5848.
- Lindeberg, Tony, and Jan-Olof Eklundh. 1990. “Scale Detection and Region Extraction from a Scale-space Primal Sketch.” In *Computer Vision, 1990. Proceedings, Third International Conference On*, 416–426.
- Lorenz, Konrad, and Nikolaas Tinbergen. 1939. “Taxis Und Instinkthandlung in Der Eirollbewegung Der Graugans. II.” *Zeitschrift Für Tierpsychologie* 2 (1-3): 1–29.
- Malamas, Elias N., Euripides GM Petrakis, Michalis Zervakis, Laurent Petit, and Jean-Didier Legat. 2003. “A Survey on Industrial Vision Systems, Applications and Tools.” *Image and Vision Computing* 21 (2): 171–188.
- Masino, M. A. 2005. “Fictive Swimming Motor Patterns in Wild Type and Mutant Larval Zebrafish.” *Journal of Neurophysiology* 93 (6) (June 1): 3177–3188.
- Matthies, Larry, Mark Maimone, Andrew Johnson, Yang Cheng, Reg Willson, Carlos Villalpando, Steve Goldberg, Andres Huertas, Andrew Stein, and Anelia Angelova. 2007. “Computer Vision on Mars.” *International Journal of Computer Vision* 75 (1) (March 20): 67–92.
- Monmasson, E., and M.N. Cirstea. 2007. “FPGA Design Methodology for Industrial Control Systems—A Review.” *IEEE Transactions on Industrial Electronics* 54 (4) (August): 1824–1842.
- Morgan, Thomas H. 1911. “An Attempt to Analyze the Constitution of the Chromosomes on the Basis of Sex-limited Inheritance in *Drosophila*.” *Journal of Experimental Zoology* 11 (4): 365–413.
- Müller, Henning, Nicolas Michoux, David Bandon, and Antoine Geissbuhler. 2004. “A Review of Content-based Image Retrieval Systems in Medical Applications—clinical Benefits and Future Directions.” *International Journal of Medical Informatics* 73 (1) (February): 1–23.
- Muller, U. K. 2004. “Swimming of Larval Zebrafish: Ontogeny of Body Waves and Implications for Locomotory Development.” *Journal of Experimental Biology* 207 (5) (February 15): 853–868.
- Muto, Akira, Michael B. Orger, Ann M. Wehman, Matthew C. Smear, Jeremy N. Kay, Patrick S. Page-McCaw, Ethan Gahtan, et al. 2005. “Forward Genetic Analysis of Visual Behavior in Zebrafish.” *PLoS Genetics* 1 (5): e66.
- Nasevicius, Aidas, and Stephen C. Ekker. 2000. “Effective Targeted Gene ‘knockdown’ in Zebrafish.” *Nature Genetics* 26 (2): 216–220.
- Naumann, Eva A, Adam R Kampff, David A Prober, Alexander F Schier, and Florian Engert. 2010.

- “Monitoring Neural Activity with Bioluminescence During Natural Behavior.” *Nature Neuroscience* 13 (4) (March 21): 513–520.
- Neuhauss, Stephan CF, Oliver Biehler, Mathias W. Seeliger, Tilak Das, Konrad Kohler, William A. Harris, and Herwig Baier. 1999. “Genetic Disorders of Vision Revealed by a Behavioral Screen of 400 Essential Loci in Zebrafish.” *The Journal of Neuroscience* 19 (19): 8603–8615.
- Noldus, Lucas PJJ, Andrew J. Spink, and Ruud AJ Tegelenbosch. 2001. “EthoVision: a Versatile Video Tracking System for Automation of Behavioral Experiments.” *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers* 33 (3): 398–414.
- Norton, William H. J. 2013. “Toward Developmental Models of Psychiatric Disorders in Zebrafish.” *Frontiers in Neural Circuits* 7.
- Odenthal, Jörg, Karin Rossmagel, Pascal Haffter, Robert N. Kelsh, Elisabeth Vogelsang, Michael Brand, F. J. Van Eeden, Makoto Furutani-Seiki, Michael Granato, and Matthias Hammerschmidt. 1996. “Mutations Affecting Xanthophore Pigmentation in the Zebrafish, *Danio Rerio*.” *Development* 123 (1): 391–398.
- Orger, Michael B, Adam R Kampff, Kristen E Severi, Johann H Bollmann, and Florian Engert. 2008. “Control of Visually Guided Behavior by Distinct Populations of Spinal Projection Neurons.” *Nature Neuroscience* 11 (3) (February 10): 327–333.
- Petzold, Andrew M., Darius Balciunas, Sridhar Sivasubbu, Karl J. Clark, Victoria M. Bedell, Stephanie E. Westcot, Shelly R. Myers, Gary L. Moulder, Mark J. Thomas, and Stephen C. Ekker. 2009. “Nicotine Response Genetics in the Zebrafish.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (44): 18662–18667.
- Pierre Drapeau, D. A., Louis Saint-Amant¹, Robert R Buss., Mabel Chong., Jonathan R McDearmid., and Edna Brustein. 2002. “Development of the Locomotor Network in Zebrafish.” *Progress in Neurobiology* 68 (2) (October): 85–111.
- Rihel, J., D. A. Prober, A. Arvanites, K. Lam, S. Zimmerman, S. Jang, S. J. Haggarty, et al. 2010. “Zebrafish Behavioral Profiling Links Drugs to Biological Targets and Rest/Wake Regulation.” *Science* 327 (5963) (January 14): 348–351.
- Rihel, Jason, and Alexander F. Schier. 2012. “Behavioral Screening for Neuroactive Drugs in Zebrafish.” *Developmental Neurobiology* 72 (3) (March): 373–385.
- Rossignol, S. 2006. “Dynamic Sensorimotor Interactions in Locomotion.” *Physiological Reviews* 86 (1) (January 1): 89–154.f
- Sage, Kingsley, and Stewart Young. 1999. “Security Applications of Computer Vision.” *Aerospace and Electronic Systems Magazine, IEEE* 14 (4): 19–29.
- Sajovic, P., and C. Levinthal. 1982. “Visual Response Properties of Zebrafish Tectal Cells.” *Neuroscience* 7 (10): 2427–2440.
- Schoonheim, P. J., A. B. Arrenberg, F. Del Bene, and H. Baier. 2010. “Optogenetic Localization and Genetic Perturbation of Saccade-Generating Neurons in Zebrafish.” *Journal of Neuroscience* 30 (20) (May 19): 7111–7120.
- Spence, Rowena, Gabriele Gerlach, Christian Lawrence, and Carl Smith. 2008. “The Behaviour and Ecology of the Zebrafish, *Danio Rerio*.” *Biological Reviews* 83 (1): 13–34.
- Stephens, Greg J., Bethany Johnson-Kerner, William Bialek, and William S. Ryu. 2008. “Dimensionality and Dynamics in the Behavior of *C. Elegans*.” Edited by Olaf Sporns. *PLoS Computational Biology* 4 (4) (April 25): e1000028.
- Suzuki, Satoshi. 1985. “Topological Structural Analysis of Digitized Binary Images by Border Following.” *Computer Vision, Graphics, and Image Processing* 30 (1): 32–46.
- Swierczek, Nicholas A, Andrew C Giles, Catharine H Rankin, and Rex A Kerr. 2011. “High-throughput Behavioral Analysis in *C. Elegans*.” *Nature Methods* 8 (7) (June 5): 592–598.
- Vermoesen, Katia, Ann-Sophie K. Serruys, Ellen Loyens, Tatiana Afrikanova, Ann Massie, Anneleen Schallier, Yvette Michotte, et al. 2011. “Assessment of the Convulsant Liability of

- Antidepressants Using Zebrafish and Mouse Seizure Models.” *Epilepsy & Behavior* 22 (3) (November): 450–460.
- Webb, Katharine J., William HJ Norton, D. Trumbach, Annemarie H. Meijer, Jovica Ninkovic, Stefanie Topp, Daniel Heck, Carsten Marr, Wolfgang Wurst, and Fabian J. Theis. 2009. “Zebrafish Reward Mutants Reveal Novel Transcripts Mediating the Behavioral Effects of Amphetamine.” *Genome Biol* 10 (7): R81.
- WHJ Norton. 2012. “Measuring Larval Zebrafish Behavior: Locomotion, Thigmotaxis, and Startle.” *Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research, 2012 - Springer*
- Wyart, Claire, Filippo Del Bene, Erica Warp, Ethan K. Scott, Dirk Trauner, Herwig Baier, and Ehud Y. Isacoff. 2009. “Optogenetic Dissection of a Behavioural Module in the Vertebrate Spinal Cord.” *Nature* 461 (7262) (September 17): 407–410.
- Y Cajal, Santiago Ramón. 2002. “Structure et Connexions Des Neurones.” *Discurso* 35 (4): 433–452.
- Yokogawa, Tohei, Wilfredo Marin, Juliette Faraco, Guillaume Pézeron, Lior Appelbaum, Jian Zhang, Frédéric Rosa, Philippe Mourrain, and Emmanuel Mignot. 2007. “Characterization of Sleep in Zebrafish and Insomnia in Hypocretin Receptor Mutants.” *PLoS Biology* 5 (10): e277.
- Zakhary, Sherry M., Diana Ayubcha, Farah Ansari, Kiran Kamran, Mehwish Karim, Joerg R. Leheste, Judith M. Horowitz, and German Torres. 2011. “A Behavioral and Molecular Analysis of Ketamine in Zebrafish.” *Synapse* 65 (2) (February): 160–167.
- Zhdanova, Irina V., Richard J. Wurtman, Meredith M. Regan, Judith A. Taylor, Jian Ping Shi, and Ojingwa U. Leclair. 2001. “Melatonin Treatment for Age-related Insomnia.” *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (10): 4727–4730.
- Zu, Yao, Xiangjun Tong, Zhanxiang Wang, Da Liu, Ruochuan Pan, Zhe Li, Yingying Hu, et al. 2013. “TALEN-mediated Precise Genome Modification by Homologous Recombination in Zebrafish.” *Nature Methods* 10 (4) (February 24): 329–331.