



**HAL**  
open science

# Microscopie de fluorescence rapide et optique adaptative pour l'étude fonctionnelle tridimensionnelle in vivo des réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire chez *Drosophila melanogaster*

Mélanie Pedrazzani

► **To cite this version:**

Mélanie Pedrazzani. Microscopie de fluorescence rapide et optique adaptative pour l'étude fonctionnelle tridimensionnelle in vivo des réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire chez *Drosophila melanogaster*. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS226 . tel-01424190

**HAL Id: tel-01424190**

**<https://theses.hal.science/tel-01424190v1>**

Submitted on 2 Jan 2017

**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.

NNT : 2015SACLS226

THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,  
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 572  
Ondes et matières

Spécialité de doctorat : Milieux dilués et optique fondamentale

Par

**Mme Mélanie Pedrazzani**

Microscopie de fluorescence rapide et optique adaptative pour l'étude fonctionnelle tridimensionnelle *in vivo* des réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire chez *Drosophila melanogaster*

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 14 Décembre 2015 :

**Composition du Jury :**

M. A. Dazzi,	Professeur, Université Paris-Sud	Président du Jury
M. J.-R. Martin	Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur
Mme M.-C. Schanne-Klein	Directrice de recherche, Ecole Polytechnique	Rapporteur
M. J.-M. Dura	Directeur de recherche, CNRS	Examineur
M. M. Tramier	Ingénieur de recherche hors classe, CNRS	Examineur
Mme C. Ventalon	Chargé de recherche, CNRS	Examineur
M. D. Nutarelli	Maître de conférences, Université Paris-Sud	Directeur de thèse





*À Paul,*



# Table des matières

## Remerciements

Introduction générale	1
<b>1 <i>Drosophila melanogaster</i>, un organisme modèle en neurobiologie</b>	<b>5</b>
1.1 De nombreux atouts confèrent à <i>Drosophila melanogaster</i> une place de choix en tant qu'organisme modèle universel pour la biologie	6
1.1.1 Un génome relativement simple et entièrement séquencé	6
1.1.2 Des similitudes génomiques avec l'homme	7
1.1.3 Un cycle de reproduction court et un élevage aisé	8
1.2 La drosophile et la mémorisation	8
1.2.1 Un cerveau relativement simple mais des comportements complexes	8
1.2.2 Une capacité d'apprentissage	9
1.2.3 Les corps pédonculés : un centre de la mémoire olfactive	11
1.3 Les outils pour les études en neurobiologie chez la drosophile	13
1.3.1 Des outils génétiques extrêmement puissants	13
1.3.1.1 Le système d'expression UAS/GAL4, un contrôle spatial précis de l'expression d'un transgène.	13
1.3.1.2 L'interférence ARN	14
1.3.1.3 Les banques de souches transgéniques	14
1.3.1.4 Le système GAL80 <sup>ts</sup> , un raffinement du système UAS/GAL4 assurant un contrôle spatio-temporel de l'expression d'un transgène	16
1.3.2 Les biosenseurs et l'imagerie cérébrale : observer et agir par voie optique	17
1.3.2.1 La visualisation des structures morphologiques du cerveau	17
1.3.2.2 Le suivi de l'activité neuronale	19
1.3.2.3 Perturbations pouvant être induites par l'expression des senseurs	24
1.3.2.4 Le photoblanchiment, une limitation inhérente à l'imagerie de fluorescence	25
1.3.2.5 Sondes fluorescentes encodées génétiquement pour l'étude de la phototoxicité engendrée par effet photochimique	25
1.3.2.6 Optogénétique : le contrôle par la lumière de l'activité neuronale	26
1.3.2.7 Thermogénétique : le contrôle de l'activité neuronale par la température	28
1.4 La préparation microchirurgicale de la drosophile pour l'imagerie <i>in vivo</i>	29
1.4.1 Le protocole de microchirurgie	29

1.4.2	La diminution des mouvements du cerveau . . . . .	30
1.4.3	La dissection par laser . . . . .	30
1.5	Conclusion . . . . .	31
<b>2</b>	<b>Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie</b>	
	<b><i>in vivo</i> du cerveau de la drosophile</b>	<b>33</b>
2.1	Microscopies optiques de fluorescence limitées par la diffraction . . . . .	35
2.1.1	Principes physiques : limite de diffraction et notion de sectionnement	
	optique . . . . .	35
2.1.1.1	La limite de diffraction . . . . .	35
2.1.1.2	Le sectionnement optique . . . . .	37
2.1.2	La microscopie conventionnelle plein champ, rapide mais sans capacité	
	de coupe optique . . . . .	37
2.1.3	Les microscopies de sectionnement optique à balayage . . . . .	38
2.1.3.1	La microscopie confocale, capable de sectionnement optique	
	mais à faible cadence d'acquisition . . . . .	38
2.1.3.2	La microscopie multiconfocale, alliance de la résolution et de la	
	vitesse . . . . .	38
2.1.3.3	La microscopie non linéaire de type biphotonique, l'accès à la	
	profondeur . . . . .	40
2.1.4	Les microscopies de sectionnement optique plein champ . . . . .	41
2.1.4.1	La microscopie à feuille de lumière . . . . .	41
2.1.4.2	La microscopie à illumination structurée . . . . .	42
2.2	La microscopie à illumination structurée de type HiLo . . . . .	43
2.2.1	Les fréquences spatiales . . . . .	43
2.2.2	Le principe de la microscopie à illumination structurée . . . . .	43
2.2.3	Microscopie HiLo et algorithme de reconstruction des images. . . . .	46
2.2.3.1	Principe de réalisation du sectionnement optique plein champ	
	HiLo . . . . .	46
2.2.3.2	L'algorithme de reconstruction de la section optique . . . . .	47
2.2.4	Le dispositif expérimental pour la microscopie HiLo . . . . .	52
2.2.4.1	Le montage optique . . . . .	52
2.2.4.2	La matrice de micro-miroirs . . . . .	53
2.2.4.3	La synchronisation du dispositif et la réalisation de coupes op-	
	tiques HiLo . . . . .	58
2.2.5	Caractérisation du microscope à illumination structurée . . . . .	59
2.2.5.1	Évaluation de la réponse impulsionnelle . . . . .	60
2.2.5.2	Réponse fréquentielle du microscope . . . . .	63
2.2.5.3	Capacité de coupe optique . . . . .	65
2.2.5.4	Réjection des basses fréquences spatiales hors mise au point . . . . .	67
2.3	Résultats : Microscopie Hilo pour l'imagerie <i>in vivo</i> du cerveau de la drosophile . . . . .	68
2.3.1	Lignées transgéniques de drosophiles . . . . .	69
2.3.2	La capacité de sectionnement optique de la microscopie HiLo . . . . .	69
2.3.3	Microscopie plein champ HiLo et microscopie confocale à balayage . . . . .	71

2.3.4	Adaptation de la fréquence spatiale du motif d'illumination pour l'imagerie HiLo tridimensionnelle. . . . .	73
2.4	Discussion . . . . .	75
2.4.1	La microscopie HiLo, une technique de coupe optique plein champ limitée par diffraction . . . . .	75
2.4.2	Choix du motif d'illumination et des paramètres de reconstruction de la microscopie HiLo . . . . .	77
2.4.3	Le sectionnement optique de la microscopie HiLo en profondeur . . . . .	80
2.5	Conclusion . . . . .	81
<b>3</b>	<b>Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur</b>	<b>83</b>
3.1	L'optique adaptative en microscopie optique de fluorescence . . . . .	86
3.1.1	Introduction . . . . .	86
3.1.2	Les aberrations optiques . . . . .	86
3.1.2.1	La déformation du front d'onde . . . . .	86
3.1.2.2	Origines des aberrations optiques . . . . .	87
3.1.2.3	L'effet des aberrations optiques . . . . .	89
3.1.3	La correction des aberrations par l'optique adaptative . . . . .	89
3.1.3.1	L'analyseur de front d'onde . . . . .	89
3.1.3.2	Le correcteur de front d'onde, élément optique actif . . . . .	91
3.1.3.3	L'optique adaptative avec mesure de front d'onde . . . . .	92
3.1.3.4	L'optique adaptative sans mesure de front d'onde . . . . .	94
3.2	Matériel et méthodes : L'algorithme d'optimisation et le montage optique . . . . .	95
3.2.1	Le procédé d'optimisation des images . . . . .	95
3.2.1.1	L'algorithme d'optimisation 3N . . . . .	95
3.2.1.2	Le choix du facteur de mérite . . . . .	95
3.2.2	La base de décomposition des aberrations . . . . .	98
3.2.3	Le montage optique . . . . .	98
3.3	Résultats : Caractérisation et performances du système . . . . .	100
3.3.1	Évaluation des aberrations différentielles entre voies d'excitation et d'émission . . . . .	100
3.3.2	Évaluation de l'extension spatiale latérale de la correction . . . . .	103
3.3.3	Évaluation de l'extension spatiale axiale de la correction dans le cerveau de la drosophile . . . . .	106
3.3.4	Stabilité temporelle de la correction pour l'imagerie <i>in vivo</i> . . . . .	108
3.3.5	Dépendance de la fréquence spatiale du motif d'excitation . . . . .	109
3.4	Résultats : Imagerie HiLo <i>in vivo</i> en profondeur dans le cerveau de la drosophile avec correction des aberrations optiques . . . . .	110
3.4.1	Amélioration du contraste de la grille . . . . .	110
3.4.2	Reconstruction HiLo . . . . .	111
3.5	Discussion et perspectives . . . . .	113
3.5.1	Une "étoile guide" plein champ intrinsèquement liée à la microscopie à illumination structurée . . . . .	113

3.5.2	La base de projection des modes d'aberrations et les modes sélectionnés pour l'optimisation du front d'onde . . . . .	114
3.5.3	Zone isoplanétique de correction des aberrations . . . . .	117
3.5.4	Perspectives : Correction avec "étoile guide" générée par excitation bi-photonique et imagerie par microscopie HiLo à un photon . . . . .	118
3.6	Conclusion . . . . .	119
<b>4</b>	<b>Microscopie multicon focale pour l'imagerie massive <i>in vivo</i> du centre de la mémorisation de la drosophile à l'échelle du neurone individuel</b>	<b>121</b>
4.1	Introduction : Objectif du projet . . . . .	122
4.2	Matériel et méthodes . . . . .	123
4.2.1	Le dispositif d'imagerie multicon focale à deux couleurs . . . . .	123
4.2.1.1	L'imagerie multicon focale "spinning disk" . . . . .	123
4.2.1.2	Résultats préliminaires de microscopie multicon focale obtenus à l'Institut Curie . . . . .	124
4.2.1.3	Le dispositif de microscopie "spinning disk" . . . . .	125
4.2.1.4	Le système DualView . . . . .	127
4.2.1.5	Performances optiques du microscope . . . . .	127
4.2.2	Le système de stimulation . . . . .	130
4.2.2.1	La cellule environnementale . . . . .	130
4.2.2.2	Le dispositif de stimulation olfactive . . . . .	131
4.2.2.3	Le dispositif de stimulation électrique . . . . .	132
4.2.2.4	La synchronisation de l'imagerie et des stimuli . . . . .	133
4.2.3	Les lignées de drosophiles . . . . .	135
4.2.3.1	Le marquage bi-couleur . . . . .	135
4.2.3.2	Préparation de la drosophile . . . . .	135
4.2.3.3	Test pharmacologique de l'état de forme de la drosophile pour les études fonctionnelles . . . . .	136
4.3	Imagerie des corps cellulaires et difficultés rencontrées . . . . .	138
4.3.1	Imagerie 5D ( $X, Y, Z, t, \lambda$ ) des corps cellulaires . . . . .	138
4.3.1.1	Imagerie "mCherry/ArcLight" . . . . .	138
4.3.1.2	Imagerie "mCherry/G-CaMP6f" . . . . .	140
4.3.2	Anisotropie de résolution . . . . .	140
4.3.3	Imagerie bi-couleur et mouvement . . . . .	141
4.3.4	Extension axiale des corps cellulaires des cellules de Kenyon et imagerie 3D . . . . .	142
4.3.5	Photoblanchiment des sondes fluorescentes . . . . .	143
4.4	Imagerie fonctionnelle des corps cellulaires et analyse globale . . . . .	145
4.4.1	Réponse à des stimulations électriques dans les corps cellulaires des cellules de Kenyon . . . . .	146
4.4.2	Réponse à des stimulations olfactives dans les corps cellulaires des cellules de Kenyon . . . . .	147
4.5	Analyse à l'échelle du neurone individuel par bioinformatique . . . . .	149
4.5.1	Compensation du mouvement . . . . .	149

4.5.2	Procédé de détection des corps cellulaires individuels . . . . .	150
4.5.2.1	Première version : Algorithme de seuillage sur l'intensité . . . . .	151
4.5.2.2	Deuxième version : Algorithme de détection de la forme . . . . .	152
4.5.3	Suivi temporel des noyaux . . . . .	154
4.5.4	Test de l'algorithme de détection sur image synthétique . . . . .	155
4.5.5	Perspectives : Quantification du signal du rapporteur fluorescent d'activité neuronale à l'échelle du neurone individuel . . . . .	156
4.6	Discussion . . . . .	157
4.6.1	Imagerie tridimensionnelle <i>in vivo</i> d'un réseau neuronal entier, résolue à l'échelle du neurone individuel . . . . .	157
4.6.2	L'imagerie de fluorescence multicon focale et la profondeur . . . . .	158
4.6.3	Algorithme de traitement des images dédié à l'imagerie du réseau mnésique	161
4.7	Conclusion . . . . .	162
<b>5</b>	<b>Électrophysiologie optique alliant imagerie HiLo haute cadence et biosenseurs fluorescents ultra-rapides</b>	<b>163</b>
5.1	Matériel et méthodes . . . . .	165
5.1.1	Imagerie optique synchronisée à haute cadence . . . . .	165
5.1.1.1	Le dispositif de microscopie . . . . .	165
5.1.1.2	La synchronisation par générateur de fonction . . . . .	166
5.1.2	Le dispositif pour délivrer la stimulation . . . . .	168
5.1.2.1	Le développement de la cellule environnementale . . . . .	168
5.1.2.2	Le boîtier de stimulation . . . . .	168
5.1.2.3	La mise en place précise des électrodes . . . . .	170
5.1.3	Préparation biologique : Génétique et protocole pharmacologique . . . . .	170
5.1.3.1	Les lignées transgéniques . . . . .	170
5.1.3.2	Standardisation de l'expérience . . . . .	171
5.1.3.3	Effet de la molécule de thapsigargine sur les réserves calciques . . . . .	172
5.1.4	Traitement informatique des données . . . . .	174
5.1.4.1	Protocole de traitement pour le moyennage de signaux . . . . .	174
5.1.4.2	Réalignement spatial latéral des piles d'images . . . . .	174
5.1.4.3	Création de cartographies HiLo de réponse aux chocs électriques en utilisant la sonde voltage ArcLight . . . . .	175
5.1.4.4	Analyse statistique . . . . .	180
5.2	Résultats : Comparaison des sondes fluorescentes calcique G-CaMP6f et voltage ArcLight . . . . .	180
5.2.1	Caractéristiques physiques . . . . .	180
5.2.1.1	Brillance . . . . .	180
5.2.1.2	Temps caractéristiques de réponse . . . . .	180
5.2.2	Étude de processus physiologiques : Sensibilisation voltage et désensibilisation calcique . . . . .	183
5.3	Résultats : Exploration, avec la sonde voltage ArcLight, du rôle des neurones GABAergiques et dopaminergiques. . . . .	188
5.3.1	Étude du rôle du récepteur GABA <sub>A</sub> dans la réponse aux chocs électriques	189

5.3.2	Étude du rôle du récepteur dopaminergique DAMB dans la réponse aux chocs électriques . . . . .	191
5.4	Résultats préliminaires : Cartographie spatiale de la réponse aux chocs électriques dans le lobe $\alpha$ . . . . .	194
5.4.1	Microscopie HiLo pour l'étude locale de la réponse des neurones au niveau de leurs projections axonales . . . . .	194
5.4.2	Évolution des taux d'excitation et d'inhibition au cours des stimulations	196
5.4.3	Colocalisation des pixels excités et inhibés . . . . .	199
5.5	Discussion . . . . .	200
5.5.1	Positionnement des temps de réponse mesurés des sondes G-CaMP6f et ArcLight par rapport aux autres systèmes . . . . .	200
5.5.2	Signaux physiologiques <i>in vivo</i> et sonde calcique G-CaMP6f . . . . .	201
5.5.3	Sonde voltage ArcLight et analyse moléculaire . . . . .	203
5.5.4	Cartographie spatiale <i>in vivo</i> de la réponse aux chocs électriques . . . . .	203
5.5.5	Microscopie optique et électrophysiologie <i>in vivo</i> . . . . .	204
5.6	Conclusion . . . . .	206
	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>207</b>
<b>A</b>	<b>Expérience de conditionnement olfactif aversif pour étudier le rôle d'une cyclase dans la formation de la mémoire à court terme</b>	<b>213</b>
A.1	Introduction . . . . .	213
A.2	Matériel et méthodes . . . . .	214
A.3	Résultats . . . . .	214
<b>B</b>	<b>Filtre LoG : Laplacian of Gaussian</b>	<b>217</b>
<b>C</b>	<b>Article 1 : Micromirror structured illumination microscope for high-speed <i>in vivo</i> drosophila brain imaging</b>	<b>221</b>
<b>D</b>	<b>Article 2 : Sensorless adaptive optics implementation in widefield optical sectioning microscopy inside <i>in vivo</i> drosophila brain</b>	<b>237</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>261</b>

# Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réussite de ma thèse.

Je remercie tout d'abord Jean-François Roch, directeur du laboratoire Aimé Cotton, pour m'y avoir accueillie.

J'adresse également mes remerciements à l'équipe Biophotonique du Laboratoire Aimé Cotton, et en particulier toutes mes pensées sont pour Paul Tchénio, parti trop tôt, qui fut un excellent directeur de thèse et a su me transmettre avec passion son savoir. Il m'a permis de réaliser ma thèse dans un environnement pluridisciplinaire alliant développement de microscopes optiques et neurobiologie de la drosophile. Toujours dans la bonne humeur, les discussions avec Paul étaient extrêmement enrichissantes. Nos échanges sur les drosophiles dans le RER ont du en étonner plus d'un.

Je voudrais également remercier Daniele Nutarelli qui m'a aussi encadré durant ma thèse tout en m'accordant une grande confiance sur la réalisation des expériences et le traitement des données. Merci aussi pour les concerts et les succulents tiramisu!

J'adresse aussi mes remerciements à François Treussart qui a réalisé un travail considérable de relecture et de correction de mon manuscrit de thèse.

Merci aussi à Alexandra Fragola et Vincent Loriette pour leur précieuse aide sur les aberrations optiques et leur soutien jusqu'au jour de la soutenance.

Je tiens à remercier grandement Aurore Masson qui m'a formée sur le dispositif expérimental (et à la fitness) dès mon arrivée dans l'équipe.

Merci à tous les stagiaires que j'ai pu encadrer et à mon tour former durant ces trois ans de thèse : Alexandra, Jérôme, Danaé, Clément et Selim.

J'adresse aussi tous mes remerciements à Marie-Claire Schanne-Klein et Jean-René Martin, qui ont eu la gentillesse d'accepter d'être les rapporteurs de ce manuscrit, ainsi qu'à Cathie Ventalon, Marc Tramier, Alexandre Dazzi et Jean-Maurice Dura, pour avoir accepté de participer au jury de ma soutenance de thèse.

Je remercie aussi les doctorants et post-doctorants du laboratoire Aimé Cotton avec lesquels j'ai pu interagir. Je remercie très chaleureusement Tarek Labidi qui m'a toujours soutenu notamment dans les moments difficiles. Merci à Aliou Ly pour son soutien au cours des derniers mois de ma thèse. Merci à Simon Haziza, alias monsieur dose banane, pour sa bonne humeur qui remotive rapidement. Merci à mes camarades du premier bureau : Issam

Manai (merci pour tout ce que tu m'as apporté), Alexandre Zuliani (merci beaucoup pour le soutien surtout en fin de thèse), Guyve Khalili et Mehdi Hamamda. C'était un plaisir de travailler à vos côtés. Merci à David Rio pour ses explications sur l'optique adaptative pour l'ophtalmologie et pour avoir bien voulu de ma participation comme cobaye pour ses expériences. Merci à toute l'équipe GLOP pour les repas partagés le midi.

Je remercie également les différents services du Laboratoire Aimé Cotton : électronique, mécanique, bureau d'étude, infrastructure et informatique pour l'aide apportée aux différents stades du projet, et plus particulièrement Hervé Michel pour son aide indispensable à chaque déménagement de l'expérience.

J'aimerais également remercier les membres de l'équipe GDSM de l'ESPCI et en particulier Thomas Preat, Valérie Goguel, Aurélie Saint Amaux, Oriane Turrel, Yann Dromard et Pierre-Yves Plaçais. Je tiens à remercier plus particulièrement Pierre-Yves Musso, qui était en deuxième de thèse à l'ESPCI quand j'ai débuté. Il m'a appris les "bases" de la biologie, merci à lui pour sa grande patience et sa pédagogie. Merci également à Nicolas Gervasi pour sa relecture de mon manuscrit.

Merci également à Felipe Delestro et Auguste Genovesio pour la collaboration naissante entre l'ESPCI et l'ENS Paris.

Je remercie également tous mes amis et notamment Samuel qui a eu la gentillesse et la patience de traquer les "petites" fautes dans tout mon manuscrit. Merci aussi à Nicolas et Quentin pour leur indéfectible soutien !

Je voudrais remercier ma famille et notamment mes parents, ma soeur et mes grands-parents pour leurs encouragements. Merci à eux d'avoir toujours cru en moi !

Je tiens à remercier tous ceux que je n'aurai pas cités et qui m'ont aidé dans la réalisation de ce projet de thèse, que ce soit scientifiquement ou pour leur soutien moral.

# Introduction générale

*« For approaching the enormous complexity of the insect brain one may choose first to study the sensory and motor periphery in the hope to finally work one's way up to the central processing stages of the brain or, alternatively, one may parachute in the midst of the jungle, experimentally altering the brain and try to understand the concomitant changes in behavior. »*

---

Martin Heisenberg, neurobiologiste  
allemand (1980)

Comprendre les rouages du vivant a toujours passionné les scientifiques. La biologie est la principale discipline qui vise à étudier la vie, à comprendre les nombreux processus qui en permettent l'existence et à déchiffrer d'éventuels dysfonctionnements. Un des organes les plus fabuleux et complexes du corps humain est le cerveau. L'interaction de très nombreux signaux électriques au sein de notre cerveau nous donne entre autres la capacité de penser, de mémoriser et la possibilité de ressentir des émotions. Un léger dysfonctionnement cérébral peut impacter toute une vie. La neurobiologie poursuit le but de comprendre comment ces signaux cérébraux encodent divers processus tels que la mémorisation, et comment des perturbations de ces signaux peuvent conduire à des pathologies neurobiologiques. Avec le vieillissement de la population, des affections neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, touchent aujourd'hui de plus en plus de personnes. Cette situation souligne l'importance d'une meilleure compréhension des mécanismes élémentaires de notre cerveau et en particulier des processus liés à la mémorisation.

Afin de cartographier l'anatomie et le fonctionnement du cerveau humain, l'imagerie neurofonctionnelle par magnétoencéphalographie, électroencéphalographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont actuellement utilisées. L'IRM fonctionnelle [1] permet par exemple de déterminer les aires cérébrales activées lors d'une action particulière. Cette localisation des régions activées dans le cerveau est effectuée grâce à une mesure du rapport de concentration entre différentes formes de la molécule d'hémoglobine impliquée dans le transport du dioxygène par voie sanguine. L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle ne permet d'atteindre que des résolutions spatiales de l'ordre de quelques milli-

mètres. Bien que des efforts soient faits pour améliorer la résolution spatiale en augmentant l'amplitude du champ magnétique utilisé, ces outils de neuro-imagerie restent insuffisants pour imager, chez l'être humain, le réseau neuronal en activité à l'échelle du neurone individuel.

Afin de faciliter les études cognitives, l'utilisation d'organisme modèle est très utile. Il en existe un très grand nombre en biologie, d'espèces variées comme la souris, le poisson zèbre, la drosophile *Drosophila melanogaster* ou le ver *C. Elegans*. La drosophile n'est certes pas un mammifère comme l'être humain, mais la majorité des processus fondamentaux ont été conservés au cours de l'évolution entre ces deux espèces. Les études sur la drosophile sont de plus facilitées par l'existence de puissants outils d'ingénierie génétique [2].

Le travail mené au cours de cette thèse, encadrée par Paul Tchénio, s'inscrit dans la démarche d'une meilleure compréhension *in vivo* des réseaux neuronaux participant à la mémorisation chez la drosophile. La structure cérébrale impliquée dans les processus d'apprentissage, appelée corps pédonculés, a déjà été identifiée [3]. Néanmoins, la distribution spatio-temporelle d'un souvenir dans cet ensemble de neurones, ainsi que la dynamique du réseau de neurones permettant le stockage et le rappel du souvenir sont encore loin d'être totalement comprises. Afin d'imager ces réseaux neuronaux en activité, la microscopie optique de fluorescence occupe actuellement une place de choix. Deux outils complémentaires sont alors indispensables à la réussite de cette étude : il faut disposer de biosenseurs fluorescents qui vont permettre de traduire fidèlement par voie optique l'activité cérébrale, mais il faut également être en mesure d'enregistrer ces signaux optiques avec une technique de microscopie adaptée en terme de résolutions spatiale et temporelle.

Les biosenseurs fluorescents les plus utilisés ont longtemps été de nature synthétique. Leur développement a bénéficié d'ingénierie moléculaire toujours plus poussée, mais leur domaine d'application est essentiellement limité au matériel biologique fixé. Le marquage fluorescent du vivant a connu une révolution avec la découverte des protéines fluorescentes (telle que la Green Fluorescent Protein, GFP) car ces dernières peuvent être encodées génétiquement et insérées dans le génome d'un animal. Les protéines fluorescentes peuvent être fusionnées avec d'autres protéines d'intérêt par ingénierie génétique. Certaines fusions ont permis de rendre la fluorescence de la protéine de fusion dépendante d'un paramètre physicochimique, tel que le flux d'ions calcium et la différence de potentiel à travers la membrane cellulaire. Il existe de plus maintenant une assez grande variété de couleurs d'émission de protéines fluorescentes couvrant tout le spectre visible. En outre, l'existence de banques publiques de drosophiles, construites au fil du temps, permet de rendre plus aisée la génération de lignées transgéniques de mouches.

Afin de mesurer le signal de fluorescence du biosenseur, rendant compte d'une facette de l'activité cérébrale, il faut utiliser le dispositif d'imagerie optique le plus adapté à la problématique biologique d'intérêt. Aujourd'hui, l'imagerie optique pour les études biologiques a atteint un tel degré de développement qu'il ne s'agit plus simplement de faire des images mais bien d'être capable de réaliser des études quantitatives et si possible fonctionnelles. Ces dernières années, des développements remarquables ont permis d'améliorer la résolution de

la microscopie optique de fluorescence en dessous de la limite de diffraction. Ces progrès ont conduit à l'attribution en 2014 du Prix Nobel de Chimie à E. Betzig [4], W. E. Moerner [5] et S. Hell [6] pour leurs travaux sur la microscopie de super-résolution. Certaines de ces techniques n'auraient pas pu voir le jour sans le développement conjoint de sondes fluorescentes conçues à cet effet, telles les sondes protéiques photoactivables [7] par exemple pour la microscopie PALM (PhotoActivated Localization Microscopy).

L'objet de cette thèse est l'imagerie fonctionnelle du réseau mnésique en utilisant la mouche *Drosophila melanogaster* comme modèle. Les études neurobiologiques faites dans le cadre de cette thèse ont été réalisées directement dans le cerveau de la drosophile vivante. Ce dernier étant relativement épais et diffusant, la technique d'imagerie utilisée doit être capable de sectionnement optique, c'est-à-dire de ne conserver, au sein d'un échantillon biologique, que l'information du plan que l'on veut effectivement observer pour ensuite éventuellement reconstituer l'activité fonctionnelle en volume par juxtaposition des coupes axiales. La modalité d'imagerie doit également être suffisamment rapide pour suivre l'activité neuronale et permettre l'imagerie tridimensionnelle. Toutes ces conditions ont conduit notre choix vers deux types de microscopies optiques : la microscopie à illumination structurée de type HiLo [8] et la microscopie multicon focale. La microscopie à illumination structurée est une technique plein champ où le façonnage du faisceau d'excitation permet après traitement d'obtenir un sectionnement optique à l'échelle micrométrique. Cette technique a été couplée à un système d'optique adaptative de façon à compenser les aberrations optiques introduites par la traversée du cerveau et à permettre une imagerie plus en profondeur. La seconde technique de microscopie utilisée lors de cette thèse est la microscopie multicon focale qui, au contraire de la microscopie HiLo, est une microscopie à balayage. La parallélisation du faisceau d'excitation permet d'augmenter la dynamique d'acquisition des images.

Mon manuscrit de thèse est composé de **cinq chapitres** dont le détail est donné ci-après.

Le **premier chapitre** présente les notions de biologie liées à l'utilisation de *Drosophila melanogaster* comme organisme modèle pour les études neurobiologiques des processus de mémorisation. Nous développons les atouts spécifiques à ce modèle, en particulier d'un point de vue génétique et comportemental. Les rapporteurs d'activité fluorescents utilisés lors de cette thèse sont remis dans le contexte du développement des biosenseurs génétiquement encodés, optimisés en terme de rapidité et de sensibilité, pour le suivi de l'activité neuronale. Plus spécifiquement, je détaille le fonctionnement ainsi que les performances des sondes fluorescentes permettant de quantifier le flux d'ions calcium et la différence de potentiel à travers la membrane cellulaire, ces deux grandeurs rendant compte de l'activité neuronale.

Le **second chapitre** est consacré, après une introduction des différentes modalités d'imagerie de fluorescence, à la description de la technique de microscopie à illumination structurée de type HiLo. Le concept, l'algorithme de reconstruction des images, la réalisation expérimentale ainsi que la caractérisation spatiale et fréquentielle de la microscopie HiLo sont présentés. L'apport de l'utilisation d'une matrice de micro-miroirs, pour réaliser la

structuration de l'illumination, est discuté en terme de rapidité, de flexibilité et d'imagerie tridimensionnelle du réseau neuronal. Enfin, je présente également des résultats d'imagerie morphologique *in vivo* des corps pédonculés dans le cerveau de la drosophile.

Dans le **troisième chapitre** je décris le concept d'aberrations optiques en microscopie, leurs origines, ainsi que leurs conséquences en terme de dégradation de la qualité des images. J'expose également les différentes stratégies d'optique adaptative pour la correction des aberrations. Je décris l'implantation d'un système d'optique adaptative sur le système de microscopie à illumination structurée HiLo, sans mesure de front d'onde, en vue de corriger les aberrations optiques introduites par le cerveau. Plus spécifiquement, je détaille l'algorithme d'optimisation, la définition d'un facteur de mérite, ainsi que le dispositif expérimental mis en œuvre, et sa caractérisation (étendue spatiale et stabilité de la correction). Enfin, je démontre l'intérêt de l'optique adaptative en réalisant des reconstructions de coupe optique HiLo jusqu'à une profondeur de 50 microns dans le cerveau de la drosophile.

L'imagerie optique *in vivo* des neurones des corps pédonculés de la drosophile a été menée sous deux approches différentes : au niveau des corps cellulaires des neurones et au niveau des projections axonales de ces neurones. Le **quatrième chapitre** présente des études d'imagerie fonctionnelle, en réponse à des stimulations olfactives, réalisées au niveau des corps cellulaires des neurones des corps pédonculés. La technique d'imagerie mise en œuvre, à savoir la microscopie multicon focale, le dispositif de stimulation ainsi que le traitement des données à l'échelle du neurone individuel y sont détaillés.

Le **dernier chapitre** présente les résultats de la combinaison de la technique d'imagerie HiLo, capable de sectionnement optique rapide, avec des biosenseurs reflétant l'activité neuronale, optimisés en terme de rapidité. Deux types de signaux s'apparentant à l'activité neuronale ont été enregistrés optiquement en réponse à des micro-stimulations électriques : la concentration calcique intracellulaire grâce à la sonde calcique G-CaMP6f [9] ainsi que l'activité électrique des neurones avec la sonde voltage ArcLight [10]. Cette sonde est sensible directement au potentiel membranaire des neurones et permet donc de rapporter l'activité neuronale de façon plus directe que ne peuvent le faire les sondes calciques. Afin d'explorer le rôle des neurones inhibiteurs GABAergiques ou excitateurs dopaminergiques dans la réponse aux stimulations, nous avons utilisé des lignées transgéniques qui en plus d'exprimer le biosenseur ArcLight, ont une expression des récepteurs dopaminergiques ou GABAergiques différente du contrôle. Le caractère biphasique de la variation de fluorescence de la sonde voltage permet également de s'intéresser à des processus biologiques tels que l'excitation et l'inhibition des neurones. Des premières expériences ont été réalisées dans le but de cartographier l'excitation et l'inhibition neuronales au niveau d'un faisceau d'axones des corps pédonculés dans le cas de stimulation par des micro-chocs électriques. Ces résultats prouvent l'apport considérable de la microscopie optique de fluorescence pour la compréhension des réseaux neuronaux chez la drosophile.

# 1

## *Drosophila melanogaster*, un organisme modèle en neurobiologie

### Sommaire

---

1.1	De nombreux atouts confèrent à <i>Drosophila melanogaster</i> une place de choix en tant qu'organisme modèle universel pour la biologie . . . . .	<b>6</b>
1.1.1	Un génome relativement simple et entièrement séquencé . . . . .	6
1.1.2	Des similitudes génomiques avec l'homme . . . . .	7
1.1.3	Un cycle de reproduction court et un élevage aisé . . . . .	8
1.2	La drosophile et la mémorisation . . . . .	<b>8</b>
1.2.1	Un cerveau relativement simple mais des comportements complexes . . . . .	8
1.2.2	Une capacité d'apprentissage . . . . .	9
1.2.3	Les corps pédonculés : un centre de la mémoire olfactive . . . . .	11
1.3	Les outils pour les études en neurobiologie chez la drosophile . . . . .	<b>13</b>
1.3.1	Des outils génétiques extrêmement puissants . . . . .	13
1.3.1.1	Le système d'expression UAS/GAL4, un contrôle spatial précis de l'expression d'un transgène. . . . .	13
1.3.1.2	L'interférence ARN . . . . .	14
1.3.1.3	Les banques de souches transgéniques . . . . .	14
1.3.1.4	Le système GAL80 <sup>ts</sup> , un raffinement du système UAS/GAL4 assurant un contrôle spatio-temporel de l'expression d'un transgène . . . . .	16
1.3.2	Les biosenseurs et l'imagerie cérébrale : observer et agir par voie optique . . . . .	17
1.3.2.1	La visualisation des structures morphologiques du cerveau . . . . .	17
1.3.2.2	Le suivi de l'activité neuronale . . . . .	19

1.3.2.3	Perturbations pouvant être induites par l'expression des senseurs	24
1.3.2.4	Le photoblanchiment, une limitation inhérente à l'imagerie de fluorescence . . . . .	25
1.3.2.5	Sondes fluorescentes encodées génétiquement pour l'étude de la phototoxicité engendrée par effet photochimique . . . . .	25
1.3.2.6	Optogénétique : le contrôle par la lumière de l'activité neuronale	26
1.3.2.7	Thermogénétique : le contrôle de l'activité neuronale par la température . . . . .	28
1.4	La préparation microchirurgicale de la drosophile pour l'imagerie <i>in vivo</i> . . .	29
1.4.1	Le protocole de microchirurgie . . . . .	29
1.4.2	La diminution des mouvements du cerveau . . . . .	30
1.4.3	La dissection par laser . . . . .	30
1.5	Conclusion . . . . .	31

---

Le but de ce chapitre est de présenter le modèle biologique, *Drosophila melanogaster*, utilisé pour les études menées au cours de cette thèse. Son positionnement en tant qu'organisme modèle, l'anatomie de la région cérébrale impliquée dans les processus de mémorisation ainsi que les outils génétiques qui lui sont associés sont détaillés dans ce chapitre. L'enjeu est de saisir toute la puissance de cet organisme comme modèle pour les études neurobiologiques et la compréhension des processus mnésiques. Les biosenseurs fluorescents utilisés pour l'imagerie morphologique et l'imagerie fonctionnelle sont présentés. L'imagerie fonctionnelle repose sur l'étude de l'activité cérébrale grâce au suivi optique de différentes voies de signalisation telles que des voies biochimiques ou électriques. Les principaux rapporteurs d'activité fluorescents utilisés dans le cadre de cette thèse sont la sonde calcique G-CaMP6f et la sonde voltage ArcLight. La méthode de préparation de l'échantillon *in vivo* mise en œuvre pour l'imagerie cérébrale optique sera exposée dans une dernière partie.

## 1.1 De nombreux atouts confèrent à *Drosophila melanogaster* une place de choix en tant qu'organisme modèle universel pour la biologie

*Drosophila melanogaster* appartient à la classe des insectes. Il s'agit d'une mouche mesurant environ 2 mm de long, communément appelée mouche du vinaigre (figure 1.1). La drosophile a été introduite dans les laboratoires de recherche en 1906 par W. Castle. En 1933, T. H. Morgan a reçu le Prix Nobel de physiologie ou médecine pour ses recherches sur le rôle des chromosomes dans l'hérédité et cela grâce à la drosophile. Ses travaux ont grandement contribué à faire de la drosophile un organisme modèle majeur.

### 1.1.1 Un génome relativement simple et entièrement séquencé

*Drosophila melanogaster* bénéficie d'environ un siècle de développement génétique qui a atteint aujourd'hui un très grand niveau de maturité. Le caryotype de la drosophile est constitué



FIGURE 1.1 – Photographie d’une drosophile. Barre d’échelle : 1 mm.

de quatre paires de chromosomes dont trois paires de chromosomes autosomes. Son génome est entièrement séquencé depuis l’an 2000 [11] et annoté. Il est composé d’environ 150 millions de paires de bases et 13000 gènes. L’annotation d’un génome consiste, à partir de la séquence nucléotidique de l’ADN, à en tirer des informations concernant la localisation des régions codantes (gènes) et leur fonction biologique. Le génome de la drosophile, au contraire de la souris *Mus musculus*, contient peu de gènes avec une redondance fonctionnelle, c’est à dire des gènes qui ont des fonctions proches et qui peuvent alors se compenser. Ainsi, chez la drosophile, la modification d’un seul gène va induire un phénotype comportemental ou morphologique. La redondance fonctionnelle complexifie la création d’animaux transgéniques, dans le cas de la souris par exemple, où il est souvent nécessaire d’invalider l’expression de plusieurs gènes afin d’interrompre la fonction d’un seul gène. La drosophile présentant un dimorphisme sexuel important, les croisements génétiques sont extrêmement facilités car les mâles et les femelles sont distinguables sans difficulté particulière. Un des seuls inconvénients de la drosophile est l’entretien régulier des lignées car la congélation des gamètes de drosophile n’est pas parfaitement maîtrisée. Néanmoins, il existe des banques publiques de mouches, qui seront décrites dans la section 1.3.1.3, pour pallier ce problème permettant aux équipes de recherche du monde entier de se procurer des lignées. Les mouches mutantes permettent des études extrêmement puissantes en neurobiologie avec la possibilité de manipuler l’activité neuronale à l’échelle du neurone comme il sera décrit dans la section 1.3.1.1.

### 1.1.2 Des similitudes génomiques avec l’homme

Malgré des centaines de millions d’années d’évolution entre la drosophile et l’homme, certaines caractéristiques ont été conservées. De nombreux gènes ayant la même fonction chez ces deux espèces, appelés gènes orthologues, ont été découverts. Par exemple, la mutation des gènes APP (pour “Amyloid Precursor Protein”) chez l’homme ou plus généralement chez les mammifères, et APPL (pour “Amyloid Precursor Protein-Like”) chez la drosophile peut être impliquée dans la maladie d’Alzheimer [12]. La maladie d’Alzheimer n’est cependant pas la seule pathologie qui peut être étudiée grâce aux recherches sur la drosophile. En effet, celle-ci sert de modèle pour des études dans des domaines très variés tels que la maladie de Parkinson [13], les troubles du sommeil, l’obésité [3], le diabète [14], l’immunologie, l’embryologie,

la cancérologie et également la neurobiologie. 75% des gènes connus chez l'homme pour être impliqués dans des pathologies ont un orthologue chez la drosophile [15]. Les séquences nucléotidiques ne sont pas les seules à présenter de grandes ressemblances entre la drosophile et l'être humain : la plupart des voies de signalisation, comme la cascade de signalisation AMPc/PKA (adénosine monophosphate cyclique/protéine kinase A) décrite dans l'annexe A, sont également conservées.

### 1.1.3 Un cycle de reproduction court et un élevage aisé

Outre ses atouts sur le plan génétique, *Drosophila melanogaster* présente d'autres caractéristiques qui facilitent la recherche scientifique. La drosophile est un petit organisme, qui peut être élevé facilement dans un tube contenant un milieu nutritif. Ainsi, son élevage est aisé et relativement peu coûteux. Le laboratoire de neurobiologie de l'ESPCI, et plus particulièrement l'équipe Gènes et Dynamique des Systèmes de Mémoire dirigée par T. Préat, possède plus de 1000 lignées de drosophiles transgéniques. Une telle collection serait impossible pour des lignées transgéniques de souris qui nécessitent de grandes infrastructures. L'élevage des abeilles, *Apis mellifera*, est également plus contraignant que celui des drosophiles car celui-ci doit être fait dans une ruche, chacune correspondant à une lignée transgénique. De plus, les abeilles ont besoin de sortir et sont donc soumises à un rythme saisonnier. Un autre atout de la drosophile est son cycle de vie extrêmement court. Il se passe seulement dix jours, pour un élevage à 25°C, entre la fécondation et l'éclosion. Ce cycle de vie permet par exemple de créer relativement rapidement des lignées transgéniques qui nécessitent en général plusieurs étapes pour leur construction. Cette faible durée inter-générationnelle rend alors les études considérablement plus rapide chez la drosophile que chez la souris par exemple. Il faut en moyenne deux mois pour construire une nouvelle lignée transgénique de drosophiles contre six mois voire un an chez la souris.

## 1.2 La drosophile et la mémorisation

### 1.2.1 Un cerveau relativement simple mais des comportements complexes

La drosophile est douée de comportements extrêmement complexes tels que le vol, la parade sexuelle ou encore la capacité d'apprentissage. Son cerveau est composé de  $10^5$  neurones quand celui de l'homme en compte environ  $10^{11}$ . L'avantage de la drosophile par rapport à d'autres organismes modèles, tels que le ver *C. Elegans* par exemple, est qu'elle possède un système nerveux central comme les mammifères. Une analogie anatomique ne peut cependant pas être faite entre les cerveaux des mammifères et celui de la drosophile dont l'organisation est radicalement différente, mais les éléments de base constituant leur système nerveux sont communs : des neurones et des cellules gliales. La communication entre neurones se fait par le même type de synapses, et de nombreux neurotransmetteurs, comme le glutamate ou le GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique), sont identiques d'une espèce à l'autre. Le cerveau de la drosophile présente l'avantage de posséder des circuits neuronaux simplifiés correspondant néanmoins à des

fonctions complexes. Le comportement complexe de la drosophile autorise une grande variété d'expériences de conditionnement.

### 1.2.2 Une capacité d'apprentissage

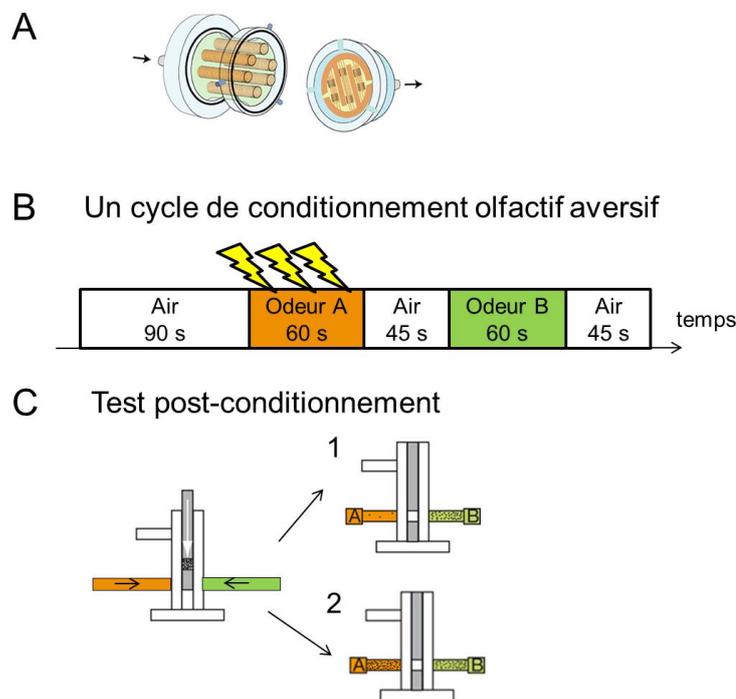


FIGURE 1.2 – Schématisation du protocole de conditionnement associatif de type olfactif aversif. (A) Dispositif dans lequel sont introduites les différentes lignées de drosophiles à conditionner. Les flèches correspondent à la circulation du flux d'odeur. Les parties en orange correspondent aux éléments électrifiables recouvrant les parois des différents trous. (B) Séquence temporelle d'un cycle de conditionnement olfactif aversif. (C) Dispositif permettant le test des drosophiles consécutivement au conditionnement. Dans la situation 1, la majorité des drosophiles sont du côté de l'odeur B et ont donc retenu l'association alors qu'elles sont équiréparties dans les deux compartiments dans la situation 2 ce qui montre qu'elles n'ont pas appris.

L'apprentissage est une caractéristique commune à de nombreuses espèces dont des formes de vie simples comme *Aplysia californica* qui possède environ 20000 neurones. E. Kandel a reçu le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 2000 pour ses travaux sur la compréhension du stockage de la mémoire chez cette limace de mer par une approche "réductionniste". La drosophile présente une complexité comportementale remarquable ce qui permet de réaliser des tests comportementaux variés pour établir des liens entre un phénotype et la mutation ou la modification de l'expression d'un gène par exemple. Il existe différents types d'apprentissage possibles chez la drosophile comme des conditionnements d'extension du proboscis, appendice permettant la succion, des conditionnements de comportement de cour, des conditionnements visuels ou des conditionnements olfactifs. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée au conditionnement associatif olfactif aversif de type pavlovien [16]. Un conditionnement

associatif repose sur l'utilisation de deux stimuli appelés stimulus inconditionnel et stimulus conditionnel. Le stimulus inconditionnel induit, à lui seul, une réponse réflexe. Dans notre cas, il s'agit d'un stimulus aversif, réalisé par l'envoi de chocs électriques, qui provoque la fuite des drosophiles. Au contraire, le stimulus conditionnel, qui sera pour notre expérience la présentation d'une odeur, n'induit pas de réponse avant apprentissage. L'apprentissage consiste à associer le stimulus conditionnel suivi du stimulus inconditionnel.

En pratique, la séquence temporelle correspondant à un cycle de conditionnement associatif de type olfactif aversif est représentée sur la figure 1.2B. Un flux d'air est d'abord diffusé pendant 90 secondes. Une première odeur, appelée odeur A sur la figure, est ensuite envoyée. Peu après, le début de la diffusion de cette odeur, le stimulus aversif est présenté. Douze chocs, d'une durée d'une seconde, sont délivrés toutes les cinq secondes pendant une minute. L'odeur, stimulus conditionnel, a une valeur prédictive car elle est diffusée peu avant l'envoi du stimulus inconditionnel. Après une courte période sans stimulation, une seconde odeur, notée odeur B, est envoyée sans choc électrique. Le groupe de T. Prémat [17] a développé un système de barillet qui permet de paralléliser le conditionnement de plusieurs groupes de mouches. Six groupes d'environ une quarantaine de drosophiles de lignées transgéniques bien identifiées sont introduits dans les trous du barillet représenté sur la figure 1.2A. Ce barillet est conçu pour pouvoir délivrer à la fois le stimulus conditionnel -flux d'odeur diffusé grâce à des pompes- et le stimulus inconditionnel -chocs électriques grâce à une grille électrifiable recouvrant les parois des tubes du barillet. Cette conception permet d'étudier en parallèle un grand nombre de drosophiles ce qui est profitable pour les études statistiques car l'apprentissage est un processus fluctuant entre individus. Elle permet également d'introduire des contrôles dans l'expérience car différentes lignées transgéniques peuvent être conditionnées simultanément.

Si le cycle de conditionnement de la figure 1.2B n'est présenté qu'une fois aux drosophiles, il s'agit d'un protocole visant à former une mémoire à court terme. Si maintenant, il est répété cinq fois avec des intervalles de repos entre chaque cycle, cela correspond à un protocole de mémoire à long terme. La mémoire à long terme repose sur la synthèse de nouvelles protéines et se maintient plusieurs jours après le conditionnement [18]. Pour le protocole de mémoire à court terme, qui est celui que j'ai utilisé lors de cette thèse, les mouches sont testées trois heures après le cycle de conditionnement grâce au dispositif présenté sur la figure 1.2C. Les drosophiles sont introduites groupe par groupe au point de convergence des deux flux odorants, odeur A et odeur B, et doivent choisir entre l'un des deux compartiments en l'absence de choc électrique. Si l'apprentissage a été réussi, les drosophiles se dirigent vers le compartiment contenant le flux d'odeur non associé précédemment aux chocs électriques, c'est-à-dire le compartiment chargé de l'odeur B dans notre cas. Le test est réalisé dans le noir complet afin d'éviter de possibles artefacts dus à la phototaxie de la drosophile, c'est-à-dire son réflexe à être attirée vers les sources lumineuses. Suite à ce test, les drosophiles contenues dans les deux compartiments sont décomptées afin de calculer un indice de performance  $IP$  tel que :

$$IP = \frac{N_- - N_+}{N_- + N_+}, \quad (1.1)$$

où  $N_-$  correspond au nombre de mouches ayant choisi le compartiment contenant l'odeur qui n'était pas associée aux chocs électriques (ici, odeur B) et  $N_+$  au nombre de mouches ayant préféré le compartiment contenant l'odeur qui était associée aux chocs électriques durant le cycle de conditionnement (odeur A). Une valeur de l'indice de performance,  $IP = 1$ , correspond à la situation où la totalité des drosophiles, conditionnées puis testées, ont retenu l'association. Dans le cas où les drosophiles sont équiréparties dans les deux compartiments, l'indice de performance vaut  $IP = 0$ . En pratique, pour éviter un quelconque artefact, une expérience complémentaire est également réalisée sur des groupes de drosophiles de même lignée transgénique en inversant le rôle des deux odeurs. L'indice de performance est alors calculé comme la moyenne des indices de performance obtenus pour les deux expériences réciproques. Lors d'une expérience classique, les scores normaux sont répartis typiquement entre 0.4 et 0.7. Ce type de protocole a permis notamment d'identifier des mutants d'apprentissage, comme *dunce* [19], *rutabaga* [20], *amnesiac* [21] ou *tequila* [22] qui présentent des mutations au niveau de différentes voies de signalisation moléculaire.

### 1.2.3 Les corps pédonculés : un centre de la mémoire olfactive

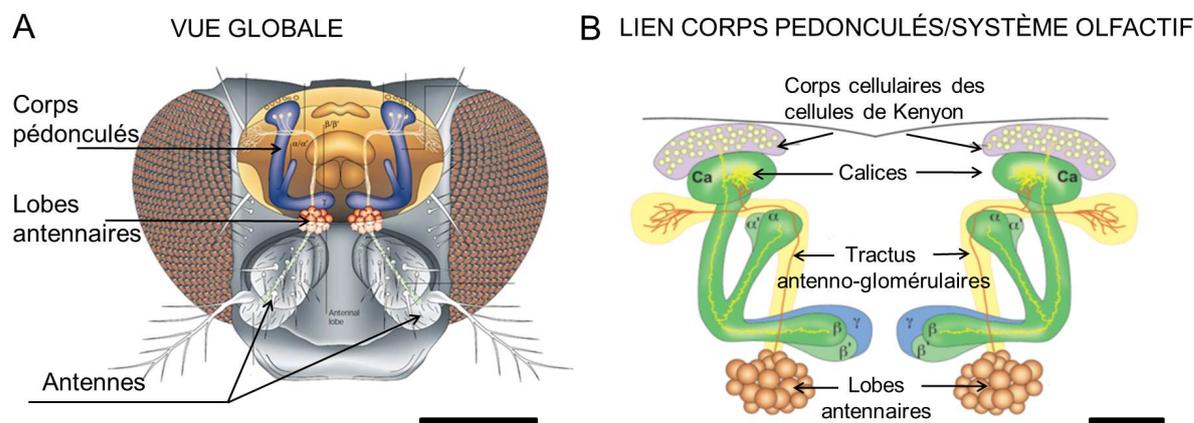


FIGURE 1.3 – Schématisation du cerveau de la drosophile et détail de la structure des corps pédonculés. (A) Localisation des antennes, des lobes antennaires (composés de glomérules) et des corps pédonculés (structure représentée en bleu) dans le cerveau de la drosophile. Cette figure est adaptée de [23]. Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ . (B) Détail de l'anatomie des corps pédonculés et du lien avec les neurones transmettant l'information olfactive. Cette figure est adaptée de [24]. Barre d'échelle : 25  $\mu\text{m}$ .

Je ne vais pas décrire ici l'anatomie globale du cerveau de la drosophile mais uniquement les corps pédonculés qui correspondent à une structure impliquée dans de nombreux processus comme le comportement de cour, le sommeil, et dans l'apprentissage olfactif comme chez d'autres insectes tels que l'abeille *Apis mellifera* ou le criquet. Les corps pédonculés, plus connus sous l'appellation "Mushroom bodies" et représentés sur la figure 1.3, constituent un centre

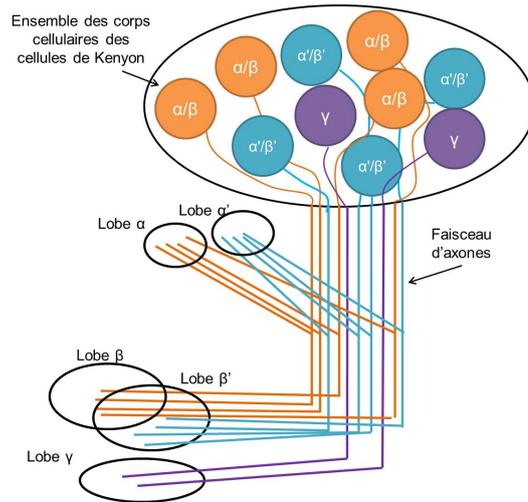


FIGURE 1.4 – Schématisation de la projection axonale des cellules de Kenyon. Les cellules de Kenyon projettent leur axone dans cinq types de lobes :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta'$  et  $\gamma$ . Le schéma ne respecte pas l'échelle biologique.

intégrateur des informations olfactives et il a été démontré qu'ils correspondent au principal centre de la mémorisation olfactive chez la drosophile [3]. Ils s'étendent dans un volume d'environ  $150 \times 100 \times 80 \mu m^3$ . L'olfaction chez la drosophile passe par les neurones olfactifs dont les récepteurs sont situés au niveau des antennes. Ces neurones projettent ensuite l'information au niveau des lobes antennaires composés de glomérules. L'information est alors relayée en partie au niveau des corps pédonculés par le tractus antenno-glomérulaire. Les corps pédonculés sont composés d'un réseau neuronal dense de neurones appelés cellules de Kenyon, au nombre de 2000 environ par hémisphère. Les corps cellulaires projettent leurs dendrites au niveau d'une région appelée calice, recevant les informations olfactives provenant des lobes antennaires. Comme montré sur la figure 1.4, il existe trois catégories de cellules de Kenyon dont les projections axonales forment différents lobes. Les neurones de type  $\alpha/\beta$  ont leurs projections axonales qui bifurquent en une branche verticale appelée lobe  $\alpha$  et une branche horizontale, le lobe  $\beta$ . Il en est de même pour les neurones de type  $\alpha'/\beta'$  dont les axones bifurquent en deux branches formant les lobes  $\alpha'$  et  $\beta'$ . Le lobe  $\gamma$  est formé des axones des neurones  $\gamma$  qui eux ne bifurquent pas. Chacun de ces types de neurones joue un rôle particulier dans les processus d'apprentissage. Par exemple, les neurones de type  $\alpha/\beta$  sont particulièrement impliqués dans la formation de la mémoire à long terme [25]. Les corps cellulaires des neurones de drosophile font environ 2 microns ce qui est très petit et rend délicat l'enregistrement de leur activité électrique par électrophysiologie [26, 27]. Les approches d'imagerie optique pour le suivi de l'activité neuronale sont donc particulièrement pertinentes pour le modèle de la drosophile car elles permettent potentiellement l'accès à des informations à l'échelle cellulaire au sein d'un réseau neuronal global.

## 1.3 Les outils pour les études en neurobiologie chez la drosophile

La drosophile étant un organisme dont la génétique est extrêmement bien maîtrisée, de nombreux outils génétiques ont été développés permettant notamment le contrôle spatio-temporel de l'expression des gènes et de l'activité neuronale.

### 1.3.1 Des outils génétiques extrêmement puissants

#### 1.3.1.1 Le système d'expression UAS/GAL4, un contrôle spatial précis de l'expression d'un transgène.

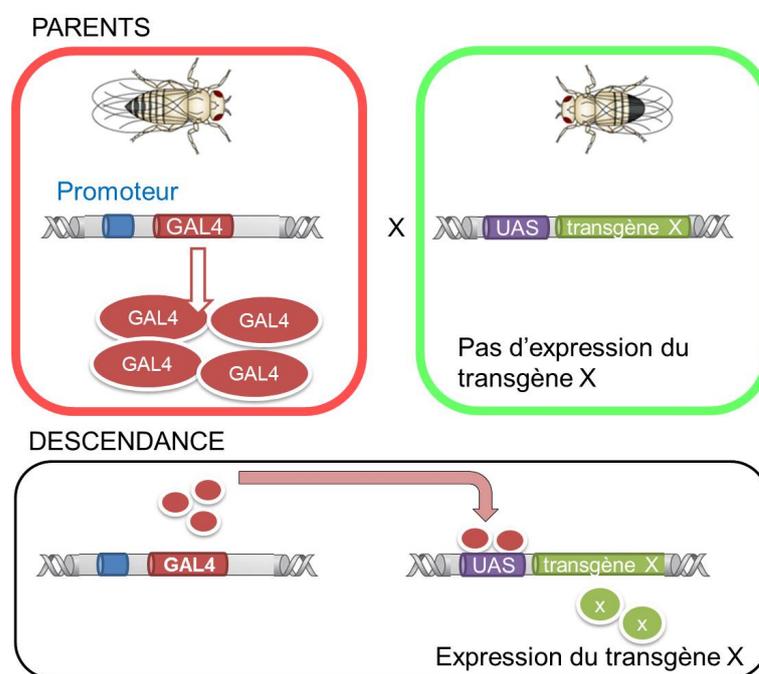


FIGURE 1.5 – Schématisation du fonctionnement du système d'expression UAS/GAL4. Seul le promoteur, représenté en bleu, est endogène.

Le transfert de transgène dans le génome de la drosophile se fait principalement en utilisant des éléments-P. Un transgène est un fragment d'ADN correspondant à la séquence du gène que l'on veut exprimer que l'on introduit dans un organisme. Pour que le transgène puisse être transmis à la descendance, il doit être inséré dans les cellules germinales d'un très jeune embryon de drosophile. Ces éléments-P, aussi appelés transposons, conduisent à l'insertion aléatoire du transgène dans le génome. Le système génétique permettant l'expression d'un transgène dans un groupe de neurones bien déterminés, le plus couramment utilisé chez la drosophile, est appelé UAS/GAL4 [2]. Un élément-P porte le gène codant pour une protéine appelée GAL4. Celui-ci s'insère aléatoirement dans le génome de la drosophile ce qui conduit à l'expression de la protéine GAL4 sous le contrôle du promoteur endogène situé en amont du site d'insertion. L'expression de ce promoteur est alors spécifique du sous-groupe de cellules

où ce promoteur est fortement exprimé. Par exemple, si l'élément-P portant GAL4 s'insère en aval d'un promoteur endogène des protéines du cytosquelette comme la tubuline ou de l'actine, la protéine GAL4 sera exprimée dans la grande majorité des cellules de l'organisme. On parle alors de promoteur ubiquitaire. Ceci n'est qu'un exemple ; dans notre cas, les pilotes d'expression utilisés vont permettre un ciblage spatial bien précis d'un sous-groupe restreint de neurones. La protéine GAL4 est issue de la levure et n'est donc pas naturellement présente chez la drosophile. Les séquences régulatrices endogènes de la drosophile ne sont pas activées par cette protéine. La deuxième composante essentielle du système UAS/GAL4 est la séquence UAS (pour "Upstream Activation Sequence") qui est une séquence régulatrice activée par la protéine GAL4. Le système d'expression UAS/GAL4 permet ainsi de générer des modèles transgéniques par croisement génétique comme représenté sur la figure 1.5. Une première drosophile, par exemple une femelle vierge, porte dans son génome le gène codant pour la protéine GAL4 en aval d'un promoteur (défini par le site d'insertion de l'élément-P). Le gène est alors transcrit dans les cellules où le promoteur est actif et la protéine GAL4 synthétisée. Mais, cette protéine à elle seule n'a pas d'effet. La drosophile mâle porte dans son génome une séquence régulatrice UAS ainsi que le gène codant pour le transgène d'intérêt en aval de celle-ci. La séquence UAS nécessitant la présence de GAL4 pour être activée, le transgène n'est pas exprimé chez cette seconde drosophile. En croisant les deux drosophiles présentées précédemment, le génome de la descendance contiendra à la fois le gène codant pour l'expression de la protéine GAL4 dans un sous-type cellulaire mais également la séquence régulatrice UAS. Le transgène sera donc exprimé dans les cellules où la molécule de GAL4 est présente. Initialement développé pour le modèle de la drosophile, le système d'expression UAS/GAL4 s'étend également aujourd'hui au poisson zèbre.

### 1.3.1.2 L'interférence ARN

L'outil génétique, présenté dans cette section, permet de réprimer spécifiquement l'expression d'un gène. Les effecteurs UAS-ARNi (ARNi pour Acide Ribonucléique Interférent) permettent l'inhibition de l'expression des gènes par l'utilisation de l'interférence ARN. Des travaux sur l'interférence ARN chez le ver *C. Elegans* ont valu le Prix Nobel de physiologie ou médecine à A. Z. Fire et C. C. Mello en 2006. Dans cette technique, des molécules d'ARN double brin dont une portion est spécifique de la séquence d'ARN ciblée sont exprimées. Celles-ci empêchent la traduction et donc l'expression de la protéine correspondante. Cet outil peut alors être employé pour déterminer par exemple les gènes essentiels à différents processus cellulaires, à différentes voies de signalisation ou encore au processus de mémorisation. Les deux lignées de UAS-ARNi, que j'ai utilisées pour les études neurobiologiques, sont présentées dans le tableau 1.1 de la section suivante.

### 1.3.1.3 Les banques de souches transgéniques

Le système génétique UAS/GAL4 tire sa puissance de l'existence de banques publiques de mouches dans lesquelles les équipes de recherche peuvent se procurer par exemple des lignées GAL4 ou des lignées UAS et ensuite procéder à des croisements génétiques pour obtenir la lignée transgénique d'intérêt. Ainsi, sur le site de "Bloomington Drosophila Stock Center at

Rapporteur	Description	Chapitre d'apparition
<i>UAS-AC76E</i> <sup>GD51975</sup>	Diminution de l'expression de l'adénylyl cyclase 76E par interférence ARN	1
<i>UAS-GFP-NLS</i>	Marquage nucléaire avec la protéine fluorescente verte GFP	2
<i>UAS-CD8-GFP</i>	Marquage cytoplasmique avec la protéine fluorescente verte GFP	2 et 3
<i>UAS-mCherry-NLS</i>	Marquage nucléaire avec la protéine fluorescente rouge mCherry	4
<i>UAS-G-CaMP6f</i>	Étude de la concentration calcique intracellulaire	4 et 5
<i>UAS-ArcLight</i>	Étude du potentiel électrique membranaire	4 et 5
<i>UAS-DAMB</i> <sup>KK105324</sup>	Diminution de l'expression du récepteur dopaminergique DAMB par interférence ARN	5
<i>UAS-RDL</i> <sup>HA</sup>	Surexpression des récepteurs GABA <sub>A</sub>	5

Tableau 1.1 – Tableau présentant les rapporteurs utilisés durant ma thèse, qui seront détaillés dans les chapitres correspondants.

Pilote d'expression	Ciblage cellulaire	Chapitre d'apparition
<i>tubulin-GAL80<sup>ts</sup> ; 238y-GAL4</i>	ensemble des cellules de Kenyon (environ 4000 neurones) avec contrôle temporel	Annexe A
<i>238y-GAL4</i>	ensemble des cellules de Kenyon (environ 4000 neurones)	2, 3 et 4
<i>G0239-GAL4</i>	deux paires de neurones (MB-V3)	4
<i>C739-GAL4</i>	neurones $\alpha/\beta$ (environ 2000 neurones)	5

Tableau 1.2 – Tableau présentant les pilotes d'expression utilisés durant ma thèse, qui seront détaillés dans les chapitres correspondants. Le principe de fonctionnement du système GAL80<sup>ts</sup> est expliqué dans la section 1.3.1.4.

Indiana University”, qui est l'une des banques de mouches, sont inventoriées :

- 3329 lignées de drosophiles contenant un insert UAS,
- 7070 lignées de drosophiles contenant un insert GAL4,
- 11560 lignées de drosophiles exprimant un ARNi spécifique d'un gène.

Un nombre considérable de pilotes d'expression "de type GAL4" et de rapporteurs "de type UAS" ont donc été développés permettant alors par simple croisement génétique de cibler spécifiquement un très petit nombre de neurones, par exemple au sein des corps pédonculés [28], avec une précision inégalée. De plus, il est possible, grâce à des lignées permettant l'expression d'un ARNi spécifique d'un gène, d'inhiber l'expression de plus de 80% des gènes de la drosophile. L'ensemble des souches transgéniques, comportant un insert UAS, GAL4, ou ARNi, utilisées pour les études neurobiologiques présentées dans cette thèse, sont répertoriées dans les tableaux 1.1 et 1.2.

### 1.3.1.4 Le système GAL80<sup>ts</sup>, un raffinement du système UAS/GAL4 assurant un contrôle spatio-temporel de l'expression d'un transgène

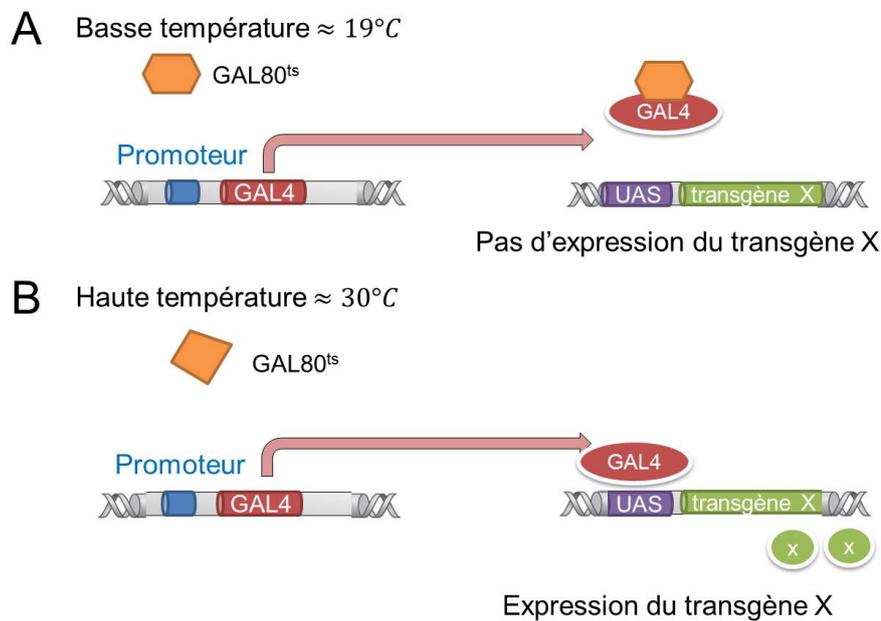


FIGURE 1.6 – Principe de fonctionnement du système GAL80<sup>ts</sup>. (A) À basse température, typiquement  $19^{\circ}\text{C}$ , la molécule de GAL80<sup>ts</sup> empêche l'expression du transgène en se fixant sur la protéine GAL4. (B) Pour une température supérieure à  $30^{\circ}\text{C}$ , la molécule de GAL80<sup>ts</sup> change de conformation ce qui la rend inactive et le transgène est alors normalement exprimé.

L'outil présenté dans cette partie vient raffiner le système d'expression binaire UAS/GAL4 décrit précédemment en permettant un contrôle non seulement spatial mais également temporel du transgène. La principale limitation du système UAS/GAL4 est que le transgène en aval de la séquence UAS est exprimé pendant tout le développement et la vie de l'animal. L'utilisation du système GAL80<sup>ts</sup> ("ts" correspondant à thermosensible) permet de restreindre temporellement l'expression du transgène [29]. La protéine GAL80<sup>ts</sup> est en effet un inhibiteur de la protéine GAL4. Son action est schématisée sur la figure 1.6. À basse température, inférieure à  $30^{\circ}\text{C}$ , la molécule GAL80<sup>ts</sup> se lie à la molécule de GAL4 la rendant inactive et empêchant sa reconnaissance des séquences régulatrices UAS et par conséquent l'expression du transgène placé en

aval de la séquence UAS. Pour des températures supérieures à 30°C, la molécule de GAL80<sup>ts</sup> est dénaturée contrairement à la molécule de GAL4 qui fonctionne à toutes les températures. Le changement de conformation de la molécule de GAL80<sup>ts</sup> la rend inactive. Ainsi, la protéine de GAL4 jouera son rôle habituel en se fixant sur la séquence régulatrice UAS et en conduisant à l'expression du transgène d'intérêt. Pour les études sur les processus mnésiques, il est alors possible de concevoir des protocoles très sophistiqués de blocage transitoire de l'expression du transgène par exemple spécifiquement durant les phases d'apprentissage, de consolidation ou de rappel du souvenir. En effet, le processus est réversible et l'action de la molécule GAL80<sup>ts</sup> est rétablie si on replace les mouches à basses températures. L'utilisation de cet outil génétique est rendue possible car la drosophile, contrairement aux mammifères, est un organisme poïkilotherme, c'est-à-dire qu'elle ne régule pas sa température qui suit alors la température ambiante. Une limitation du système GAL80<sup>ts</sup> est sa dynamique temporelle : il faut plusieurs heures pour changer le caractère actif/inactif de la molécule de GAL80<sup>ts</sup>. Cet outil génétique a été utilisé, au cours de ma thèse, notamment pour étudier le rôle d'une enzyme dans la formation de la mémoire à court terme. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'annexe A.

### 1.3.2 Les biosenseurs et l'imagerie cérébrale : observer et agir par voie optique

L'utilisation de rapporteurs fluorescents encodés génétiquement permet de tirer profit des outils génétiques très raffinés développés pour le modèle de la drosophile et d'utiliser alors la machinerie cellulaire pour exprimer les protéines d'intérêt. Cela permet un contrôle spatial de l'expression des rapporteurs avec le système UAS/GAL4, et un contrôle spatio-temporel en utilisant le système GAL80<sup>ts</sup>. L'utilisation de biosenseurs fluorescents encodés génétiquement permet de faire à la fois des études morphologiques et fonctionnelles de l'activité cérébrale.

#### 1.3.2.1 La visualisation des structures morphologiques du cerveau

Une des molécules les plus utilisées en microscopie de fluorescence est la GFP (pour "Green Fluorescent Protein"). Cette molécule a été découverte chez la méduse *Aequorea Victoria* et a valu le prix Nobel de Chimie en 2008 à O. Shimomura, M. Chalfie et R. Tsien. Sa structure consiste en un "tonneau" contenant le fluorophore, qui est le centre actif à l'origine de la fluorescence, afin de le protéger du milieu environnant (figure 1.7A). Le mécanisme d'émission de la lumière par la molécule GFP est appelé fluorescence. Il s'agit d'un processus incohérent, c'est-à-dire sans conservation de l'énergie, au cours duquel l'absorption de photons par la molécule de GFP la conduit dans un état excité d'énergie notée  $E_1$  sur la figure 1.7B pendant une durée typique de l'ordre de la nanoseconde appelée temps de vie de fluorescence. Une partie de l'énergie est ensuite perdue par désexcitation vibrationnelle puis la molécule peut revenir dans son état fondamental d'énergie  $E_0$  en émettant un rayonnement de longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde du rayonnement d'excitation. Ce décalage vers les grandes longueurs d'onde de l'émission par rapport à l'excitation est appelé décalage de Stokes et est dû à la perte d'énergie par relaxation vibrationnelle. La protéine de GFP originelle dite sauvage ("wild type GFP") présentent deux pics d'excitation vers 395 et 475 nm avec une émission vers 505 nm. Cette molécule a ensuite été modifiée par ingénierie génétique aboutis-

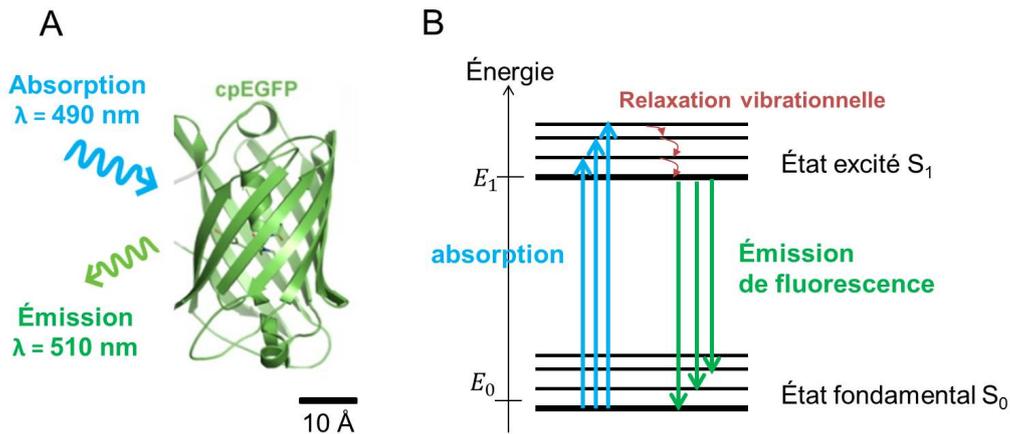


FIGURE 1.7 – Caractéristiques spectrales de la molécule cpEGFP et principe de fonctionnement de la fluorescence. (A) Structure cristallographique de la protéine cpEGFP et caractéristiques spectrales d’absorption et d’émission. (B) Diagramme d’énergie simplifié expliquant le mécanisme de fluorescence.

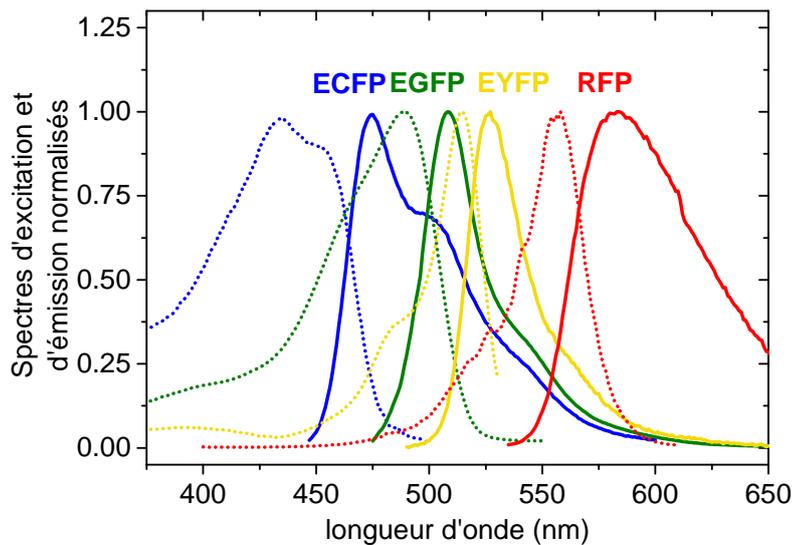


FIGURE 1.8 – Spectres d’excitation et d’émission de quatre protéines fluorescentes : ECFP, EGFP, EYFP et RFP correspondant à des molécules émettant dans le bleu, le vert, le jaune et le rouge. Les spectres d’excitation et d’émission sont représentés respectivement en trait pointillé et en trait plein.

sant à la protéine cpEGFP (pour “circularly permuted enhanced GFP”) présentant une plus grande photostabilité et une émission de fluorescence accrue. Elle absorbe des rayonnements de couleur bleue, typiquement aux alentours de 490 nm et émet dans le vert à environ 510 nm. Différentes variantes de cette molécule fluorescente ont ensuite été développées afin d’élargir la gamme spectrale accessible pour la microscopie de fluorescence. Les spectres d’excitation

et d'émission de quelques unes de ces molécules fluorescentes sont donnés sur la figure 1.8. L'accès à une palette de molécules fluorescentes étendue spectralement a conduit notamment à des projets tels que "Brainbow". Ce projet consiste à étudier la connectomique, c'est-à-dire établir une cartographie des connections au sein du système nerveux d'un organisme, afin d'être capable de suivre chaque neurone individuellement de ses projections dendritiques à ses projections axonales au sein du circuit neuronal. La technique a d'abord été développée chez la souris [30] puis s'est étendue à des invertébrés comme la drosophile [31]. Chaque neurone exprime en quantité aléatoire une combinaison de fluorophores dérivés de la GFP émettant à différentes longueurs d'onde. Ainsi, chaque neurone peut être repéré par une "couleur d'émission" différente.

La grande force de l'utilisation conjointe de l'imagerie optique et des sondes fluorescentes encodées génétiquement est la possibilité non seulement de réaliser des expériences d'imagerie morphologique dans des régions biologiques d'intérêt mais également de faire de l'imagerie fonctionnelle visant à identifier *in vivo* les circuits de neurones actifs. Des exemples de biosenseurs fluorescents permettant de sonder l'activité cérébrale, que j'ai pu utiliser durant ma thèse, sont donnés dans la section suivante.

### 1.3.2.2 Le suivi de l'activité neuronale

Les neurones étant des cellules complexes capables d'activité électrique et biochimique, il existe de nombreuses modalités d'imagerie fonctionnelle pour l'analyse de l'activité neuronale *in vivo*. Les développements de rapporteurs encodés génétiquement permettent de suivre spécifiquement dans certains neurones l'activation de différentes voies moléculaires. Des senseurs ont été développés à cet effet pour différentes voies de signalisation intracellulaire : le largage de vésicules synaptiques [32], la synthèse de molécules telles que l'AMPc [33] ou les flux d'ions calcium cytoplasmiques (articles de revue : [34, 35, 36, 37, 38]).

Les sondes principalement utilisées en neurobiologie chez la drosophile sont des sondes basées sur les échanges calciques. En effet, les ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires sont des seconds messagers universels impliqués dans de nombreux processus physiologiques dont la communication neuronale. La concentration en ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme des neurones est environ 10000 fois plus basse que celle du milieu extracellulaire. Lors du passage d'un potentiel d'action, des ions calcium entrent dans le cytoplasme des neurones. Le suivi de cette voie de signalisation biochimique est donc d'un grand intérêt pour l'étude de l'activité neuronale. Ainsi, de nombreux indicateurs calciques ont été développés : on compte actuellement plus d'une centaine d'indicateurs calciques synthétiques ou encodés génétiquement GECI (pour "Genetically Encoded Calcium Indicator"). Tous ces indicateurs reposent sur le même mode de fonctionnement, à savoir des propriétés d'absorption ou d'émission variant suivant le couplage ou non à des ions calcium. Les indicateurs calciques les plus couramment utilisés, il y a quelques années, étaient les indicateurs synthétiques comme le fura-2, le fluo-4 ou l'Oregon Green BAPTA-1 AM ester (BAPTA : acide 1,2-bis(o-aminophénoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique, AM ester : acétométhylester). La limitation de ce type de sondes pour des études *in vivo* est l'impossibilité de les exprimer dans des sous-populations de neurones

spécifiques ou dans des compartiments sub-cellulaires bien déterminés. C'est pour dépasser cette limitation qu'ont été développées de nombreuses familles de sondes calciques encodées génétiquement. Certaines de ces sondes sont constituées d'une seule protéine fluorescente telles que Camgaroo, Pericam, GECO et G-CaMP et d'autres sont basées sur l'utilisation de deux protéines fluorescentes et du mécanisme FRET (Förster Resonance Energy Transfer), comme par exemple la sonde TN-XXL [39] ou la sonde Cameleon [40]. Les caractéristiques les plus importantes pour le choix de la sonde appropriée à la problématique biologique sont :

- la variation maximale du signal de fluorescence entre l'état basal, état non liant du calcium, ( $F_{\min}$ ) et l'état liant du calcium ( $F_{\max}$ ),
- les temps de réponse à l'excitation et de retour à l'état basal,
- la taux d'affinité pour le calcium, exprimé à l'aide du paramètre  $K_d$ . Plus la valeur de  $K_d$  est petite, plus la sonde a une grande affinité pour le calcium et donc plus la saturation sera rapide en terme de variation de concentration calcique. Cette constante de dissociation  $K_d$  renseigne alors sur la gamme de variation de la concentration calcique intracellulaire sur laquelle la sonde est sensible.

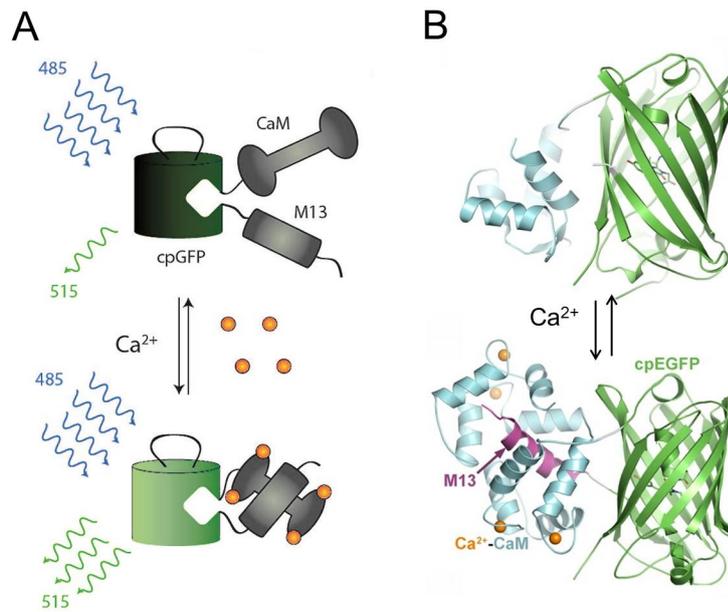


FIGURE 1.9 – (A) Principe de fonctionnement des sondes calciques de la famille G-CaMP. La figure est adaptée de [41]. (B) Structure cristallographique de la molécule G-CaMP. La figure est adaptée de [42]. Pour (A) et (B), en haut se trouve la forme non liante du calcium et en bas la forme liante du calcium de la molécule G-CaMP. Dans la forme non liante, le chromophore qui se trouve dans le “tonneau” de la protéine fluorescente (cpEGFP) est exposé au milieu intracellulaire ce qui le rend peu fluorescent. Dans la forme liante, le chromophore est protégé par le “tonneau” et fluoresce avec sa plus grande efficacité.

Au cours de mes travaux, j'ai plus particulièrement utilisé une sonde calcique de la famille des G-CaMP que je vais décrire ici. La sonde G-CaMP est une molécule créée par fusion de la molécule fluorescente cpEGFP avec la calmoduline (CaM) et la séquence peptidique

appelée M13, comme représenté sur la figure 1.9. La calmoduline est une molécule pouvant se lier à quatre ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$ . Lorsque la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  est faible, la molécule de G-CaMP est faiblement brillante car son chromophore est exposé au milieu intracellulaire. Lors du passage d'un potentiel d'action, des canaux membranaires s'ouvrent laissant entrer des ions  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu extracellulaire vers le cytoplasme. La concentration intracellulaire en ions  $\text{Ca}^{2+}$  augmente alors conduisant à un changement conformationnel de la molécule G-CaMP. Ce réarrangement se traduit par une variation importante de son rendement de fluorescence. La fluorescence émise par la sonde G-CaMP est alors plus importante qu'à l'état basal [42, 43].

La première version de cette sonde, G-CaMP1 a été développée en 2001 et présente une augmentation d'un facteur 4.3 de sa fluorescence entre l'état non liant et l'état liant du calcium [44]. Sa très faible brillance a été améliorée conduisant au développement de la sonde G-CaMP1.6 et des sondes G-CaMP de seconde génération G-CaMP2 [45, 46, 47, 48]. La G-CaMP3 a été optimisée de façon à présenter une variation de fluorescence triplée par rapport à la sonde G-CaMP1 [49]. Les avancées les plus récentes concernent davantage la rapidité et la dynamique de variation de la fluorescence avec le développement des G-CaMP5 (5A, 5D, 5G, 5K et 5L) et G-CaMP6 (6f "fast", 6m "medium", 6s "slow") [9, 50]. La sonde G-CaMP6f est la version la plus optimisée en terme de rapidité de la famille des G-CaMP6. C'est la sonde calcique que j'ai utilisée lors de ma thèse pour suivre des réponses neuronales à des stimulations très brèves de type micro-chocs électriques. Son temps de réponse est estimé à quelques centaines de millisecondes. Sa variation de fluorescence est très importante lors de l'activation avec un rapport  $F_{\max}/F_{\min}$  valant 29.2 en comparaison de la sonde G-CaMP3 pour laquelle ce rapport vaut 12.0. La constante de dissociation de la sonde G-CaMP6f reste néanmoins très proche de celle de la sonde G-CaMP3 ( $K_d = 290 \text{ nM}$ ). Cette sonde est donc suffisamment sensible pour mesurer les variations de calcium intracellulaire en réponse à des stimulations chez la drosophile car la sonde G-CaMP3 est traditionnellement utilisée à cet effet [49, 51, 52]. Les sondes calciques ont atteint un degré de maturité important avec de nombreux développements ces dernières années concernant la rapidité, la photostabilité, la sensibilité, permettant des études optiques quantitatives de l'activité neuronale *in vivo* chez la drosophile, le poisson zèbre ou la souris par exemple. Des développements ont également été menés concernant le domaine spectral des sondes calciques avec non seulement des sondes émettant dans le vert mais également à plus basse et à plus haute longueur d'onde, facilitant l'imagerie multi-couleur [53, 54]. L'utilisation de sondes émettant dans le rouge permet une imagerie en profondeur avec moins d'absorption et de diffusion par les tissus biologiques à la fois à l'excitation et à l'émission. Cela autorise aussi l'utilisation simultanée de sondes calciques pour l'imagerie fonctionnelle et d'actuateurs optogénétiques activables dans le bleu, sans recouvrement spectral. Ces outils optogénétiques seront décrits dans la section 1.3.2.6. Récemment, des sondes photoactivables sensibles à la concentration intracytoplasmique en calcium, de la famille des sondes G-CaMP, ont été développées [55]. Ces sondes présentent le grand intérêt de permettre à la fois une imagerie morphologique avec un bon contraste par photoactivation, et une imagerie fonctionnelle calcique des réseaux neuronaux par exemple.

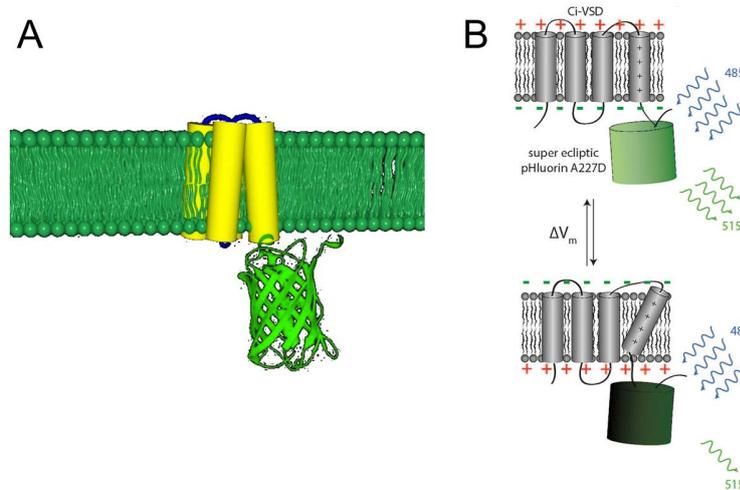


FIGURE 1.10 – Principe de fonctionnement de la sonde voltage ArcLight. (A) Représentation schématique de la sonde fluorescente fixée sur la membrane cellulaire. (B) Schématisation de la variation de fluorescence de la sonde lors d’une dépolarisation des neurones. La figure est extraite de [41].

La principale limitation de l’utilisation du signal calcique est le fait que c’est une mesure indirecte de l’activité neuronale. En effet, le senseur idéal en terme de neurobiologie pour étudier un réseau neuronal en activité serait une sonde fluorescente encodée génétiquement sensible directement au potentiel membranaire des neurones. L’information neuronale se propage dans le cerveau sous forme de signaux électriques. Ainsi le potentiel membranaire, correspondant à la différence de potentiel électrique entre l’intérieur et l’extérieur du neurone, est considéré comme le signal d’intérêt le plus direct pour étudier l’activité neuronale. Néanmoins, l’imagerie du potentiel de membrane est difficile de part la nature même des signaux électriques. En effet, elle requiert l’utilisation de sondes fluorescentes suffisamment rapides pour suivre la variation du potentiel membranaire qui se déroule sur une échelle de temps typique de l’ordre de la milliseconde. Les sondes doivent également être assez sensibles pour avoir un rapport signal sur bruit suffisant d’autant plus que ces sondes étant fixées à la membrane, cela réduit leur expression volumique en comparaison de sondes qui sont exprimées dans le cytosol des cellules. Les sondes sensibles au potentiel membranaire sont appelées sondes voltage. Les premières sondes voltage à avoir été développées, comme dans le cas des senseurs calciques, étaient des sondes synthétiques [56] qui permettaient de rapporter l’activité électrique avec une résolution temporelle de l’ordre de la milliseconde [57]. Néanmoins, ces sondes synthétiques souffrent de deux grandes limitations : un marquage non spécifique et une toxicité. Des sondes encodées génétiquement, VSFP (pour “Voltage-Sensitive Fluorescent Protein”), permettent désormais le ciblage et l’expression spécifique dans les neurones d’intérêt [58, 59]. Ces sondes présentaient toutefois à leur début un grand manque de sensibilité qui explique que les sondes calciques, qui étaient alors disponibles, aient alors été largement employées en substitution pour les études neurobiologiques par imagerie optique. Ces sondes génétiques sensibles au potentiel membranaire se sont améliorées au cours des années (articles

de revue : [60, 61, 62]), tant en sensibilité [63] et en rapidité [64] que sur leur capacité à cibler correctement les membranes plasmiques des neurones dans des milieux *in vitro* et *in vivo*. Elles ont atteint aujourd’hui un degré de maturité suffisant pour être employées afin de répondre à de réelles questions physiologiques au sein d’une grande population de neurones. Leur utilisation permet de surpasser, en terme de nombre de neurones étudiés en parallèle, l’électrophysiologie classique qui consiste à enregistrer l’activité électrique des neurones avec des électrodes. La sonde voltage, que j’ai utilisée lors de ma thèse, est appelée ArcLight et a été optimisée en sensibilité pour être utilisable pour l’imagerie cérébrale *in vivo* de la drosophile [10, 65, 66]. Une schématisation de la sonde voltage ArcLight ainsi que son principe de fonctionnement sont donnés à la figure 1.10. La sonde voltage ArcLight consiste en la fusion d’une variante de la molécule de GFP sensible au pH, la pHluorin écliptique avec la mutation A227D, et de la phosphatase sensible au voltage issue de l’animal marin *Ciona intestinalis*. Lors du passage d’un potentiel d’action, le domaine chargé positivement va être le “senseur” du potentiel et modifier sa conformation. Cela conduit à un changement d’encombrement stérique du rapporteur pHluorin écliptique et par conséquent à une variation de son intensité de fluorescence. Une dépolarisation de la membrane plasmique entraîne une diminution de la fluorescence du fluorophore.

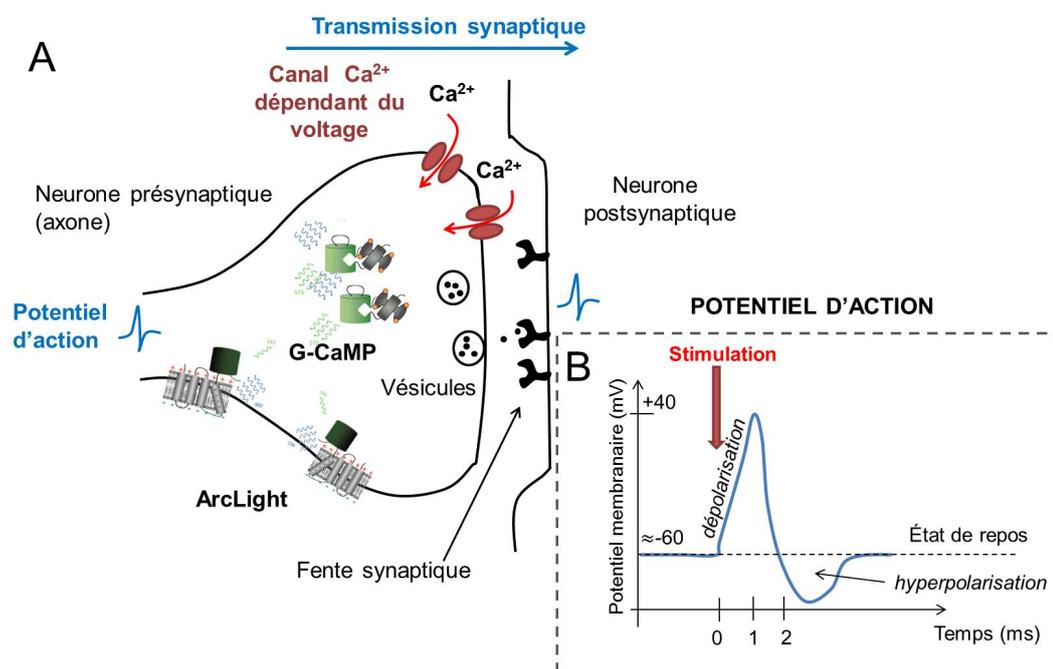


FIGURE 1.11 – Schématisation d’un potentiel d’action et du suivi optique de l’activité neuronale avec les rapporteurs fluorescents encodés génétiquement : G-CaMP6f et ArcLight. (A) Schématisation du suivi de la propagation d’un potentiel d’action par des biosenseurs fluorescents. La sonde G-CaMP6f est exprimée dans le cytoplasme des neurones tandis que la sonde voltage ArcLight est ancrée à la membrane. Les vésicules contiennent des molécules de neurotransmetteurs. (B) Schématisation des différentes phases d’un potentiel d’action.

La figure 1.11A schématise l'utilisation des sondes calciques et voltage pour sonder l'activité neuronale ainsi que la localisation de leur expression au niveau des neurones. Lors de la propagation d'un potentiel d'action, la membrane plasmique des neurones subit un changement rapide de son potentiel (figure 1.11B). Au repos, le potentiel membranaire est d'environ -60 mV. Après application d'une stimulation, le potentiel membranaire augmente jusqu'à atteindre +40 mV. Il s'agit de la phase de dépolarisation du neurone correspondant à son excitation. Le potentiel diminue ensuite jusque -90 mV environ. Lors de cette phase, appelée hyperpolarisation, le potentiel membranaire est inférieur à sa valeur au repos correspondant à une inhibition du neurone. Le potentiel remonte enfin à sa valeur au repos. Lors du passage du potentiel d'action, des canaux sensibles au voltage s'ouvrent laissant entrer entre autres des ions calcium dans le neurone. La sonde calcique exprimée dans le cytosol des neurones traduit alors par une variation de sa fluorescence cette variation de concentration calcique intracellulaire. La sonde voltage ArcLight, ancrée à la membrane des neurones, permet un accès direct à l'information du potentiel membranaire. Dans le cas de mon étude, l'intérêt n'a pas été de sonder l'activité neuronale à l'échelle du potentiel d'action unique mais de suivre l'activité générale des neurones des corps pédonculés de la drosophile.

Hormis le suivi de l'activité électrique des neurones ou de la concentration calcique dans les neurones, le développement des sondes fluorescentes encodées génétiquement permet d'étendre les modalités de suivi de l'activité neuronale qui peuvent être étudiées par voie optique. Ainsi, certaines sondes, comme la SynaptopHluorin [32], permettent par exemple de suivre l'activité synaptique. Lors de la propagation de l'information neuronale, le passage d'un potentiel d'action conduit à la fusion de vésicules contenant des neurotransmetteurs avec la membrane du neurone présynaptique. Lorsque les vésicules de neurotransmetteurs sont libérées dans le milieu extracellulaire, le pH augmente conduisant à une augmentation de la fluorescence de ce fluorophore.

### 1.3.2.3 Perturbations pouvant être induites par l'expression des senseurs

Les biosenseurs fluorescents sont les candidats idéaux pour sonder l'activité neuronale *in vivo* d'une grande population de neurones sans les perturbations mécaniques induites par l'implantation d'électrodes dans le cerveau. Toutefois, il faut garder à l'esprit que ces sondes peuvent dans une certaine mesure affecter le comportement normal du cerveau. En effet, la réponse en fluorescence des sondes calciques nécessite que des ions calcium se fixent à l'élément liant du calcium (la molécule de calmoduline dans le cas des sondes calciques de type G-CaMP). Si les sondes sont exprimées en trop fortes quantités dans les neurones, leur mécanisme d'action peut perturber la dynamique calcique endogène et interagir de façon délétère avec des compartiments cellulaires [67]. Cela peut alors affecter le fonctionnement normal des neurones [49] ainsi que le comportement de l'animal ([68], étude menée chez le ver *C. Elegans* avec la sonde calcique "Yellow Cameleon 2.12" qui présente une grande affinité pour le calcium). Concernant les drosophiles, la capacité par exemple à éviter les chocs électriques ou un flux odorant aversif est testée afin de s'assurer que les sondes utilisées n'induisent pas de grandes perturbations physiologiques.

### 1.3.2.4 Le photoblanchiment, une limitation inhérente à l'imagerie de fluorescence

Une des limitations de l'utilisation des sondes fluorescentes encodées génétiquement pour l'imagerie optique *in vivo* est le phénomène de photoblanchiment. Il correspond à l'altération photochimique du fluorophore conduisant à une diminution progressive de son intensité de fluorescence. L'intensité du phénomène de photoblanchiment dépend notamment de la nature des sondes utilisées mais également énormément de la technique d'imagerie mise en œuvre. Chaque fluorophore est caractérisé par un nombre de cycles d'excitation/déexcitation qu'il peut réaliser avant d'être détruit. Ce nombre dépend non seulement de la structure moléculaire mais également du milieu environnant du fluorophore. Par exemple, les sondes encodées génétiquement de type GFP sont moins sensibles au photoblanchiment que des sondes synthétiques (telles que la fluorescéine) dans des conditions d'expérimentation équivalentes, du fait la protection du fluorophore par le "tonneau" dans le cas de la molécule de GFP. Le photoblanchiment peut être réduit en limitant le temps d'exposition des fluorophores à la lumière d'excitation ou en diminuant sa puissance. Cependant, ce sont des solutions peu satisfaisantes car elles contribuent également à diminuer le signal de fluorescence à mesurer. Il existe certaines techniques qui visent à désoxygéner le milieu ou à ajouter des agents chimiques limitant le photoblanchiment. Ces méthodes ne sont néanmoins pas adaptées dans le cas d'échantillons vivants.

Des sondes moins sensibles au photoblanchiment, appelées boîtes quantiques (plus connues sous l'appellation anglaise "quantum dot"), ont été développées ces dernières années. Il s'agit de nanocristaux constitués de matériaux semi-conducteurs, tels que le sélénure de cadmium (CdSe), émettant de la fluorescence dont la longueur d'onde dépend de la taille de la structure. Ils présentent des qualités très intéressantes pour l'imagerie optique, à savoir une grande brillance, une grande résistance au photoblanchiment [69, 70], une grande gamme spectrale d'émission accessible. Les boîtes quantiques peuvent de plus être fonctionnalisées en les liant à des biomolécules qui vont cibler des marqueurs cellulaires d'intérêt. Les fluorophores, de type boîte quantique, grâce à leurs excellentes propriétés optiques, pourraient à terme éclipser les sondes fluorescentes synthétiques. Néanmoins, comme il ne s'agit pas de protéine, ils ne peuvent pas être encodés génétiquement. Dans le cas de la drosophile, dont la génétique est incroyablement développée, le recours aux sondes fluorescentes encodées génétiquement, permettant de suivre des voies de signalisation cellulaire de plus en plus diverses, reste donc la technique de choix. En pratique dans les études que j'ai réalisées au cours de cette thèse, le photoblanchiment n'a pas été un processus rédhibitoire aux puissances d'excitation lumineuses utilisées que ce soit en microscopie à illumination structurée, ou en microscopie multicon focale.

### 1.3.2.5 Sondes fluorescentes encodées génétiquement pour l'étude de la phototoxicité engendrée par effet photochimique

Si tout le monde s'accorde pour dire que la phototoxicité est liée à la quantité de lumière délivrée sur l'échantillon, la communauté ne connaît pas de manière exacte l'ensemble des paramètres influençant la phototoxicité à savoir la modalité d'imagerie (à balayage, plein champ), la source d'excitation (cohérente, incohérente), la nature de l'excitation (linéaire ou

non) ou encore la longueur d'onde utilisée pour l'excitation. La phototoxicité ne se résume pas au seul photoblanchiment des fluorophores. Elle est intimement liée au système biologique étudié. L'augmentation dans l'organisme de la concentration en dérivés réactifs de l'oxygène, comme les radicaux libres, les ions oxygénés ou les peroxydes peut être signe de phototoxicité (phénomène appelé stress oxydant) conduisant à terme à la mort cellulaire. Il existe des sondes fluorescentes encodées génétiquement qui permettent de sonder la concentration intracellulaire en dérivés réactifs de l'oxygène. Une sonde fluorescente encodée génétiquement, roGFP2-Orp1, a été développée chez la drosophile [71]. Cette sonde, de type ratiométrique, est basée sur l'expression au niveau des mitochondries d'une variante de molécule de GFP sensible au degré d'oxydation roGFP, couplée à la protéine Orp1 senseur du peroxyde d'oxygène  $H_2O_2$ . Les mitochondries sont les premiers organites cellulaires à ressentir le stress oxydant. Dans le cas de mon étude, l'imagerie optique n'a jamais conduit à la mort d'une drosophile sous le microscope. La préparation microchirurgicale de la drosophile pour l'imagerie, qui sera décrite dans la section 1.4, est probablement l'étape la plus délicate pour l'état de forme et la survie de la drosophile, plus que le flux de photons utilisés pour l'imagerie.

Les deux prochaines sections, optogénétique et thermogénétique, permettent d'illustrer la puissance de l'alliance de la photonique et de la génétique moléculaire. L'opto- et la thermogénétique ne se limitent plus simplement à observer des structures dans le cerveau ou même à suivre l'activité calcique ou électrique des neurones, mais combinées au système d'expression UAS/GAL4, ces techniques conduisent à un contrôle spatio-temporel de l'activité des neurones. Je n'ai pas utilisé ces outils au cours de ma thèse mais je tiens tout de même à les mentionner car ils constituent une avancée majeure pour l'analyse fine *in vivo* des circuits neuronaux pour les années à venir.

### 1.3.2.6 Optogénétique : le contrôle par la lumière de l'activité neuronale

L'optogénétique permet le contrôle par la lumière de l'activité de neurones qui, par ingénierie génétique, expriment au niveau de leur membrane des canaux ioniques sensibles à la lumière. Il est alors possible de contrôler spatialement et temporellement l'activité de neurones bien ciblés dans des animaux vivants avec des résolutions temporelles de l'ordre de la milliseconde. Le contrôle spatial est rendu possible grâce à l'utilisation du système d'expression UAS/GAL4. Les actuateurs optogénétiques, représentés sur la figure 1.12A sont des canaux ioniques tels que la channelrhodopsine, l'archaerhodopsine ou la halorhodopsine. La halorhodopsine, issue de la bactérie *Halobacterium* est un canal ionique spécifique des ions chlorure  $Cl^-$ . Lorsque ce canal est illuminé avec des radiations aux alentours de 570 nm, celui-ci pompe des ions chlorure à l'intérieur des neurones à la membrane desquels il est exprimé. Ce flux d'anions vers l'intérieur des neurones conduit à une hyperpolarisation, c'est-à-dire à une inhibition, des neurones concernés. L'archaerhodopsine conduit également à l'inhibition des neurones ciblés par pompage des protons  $H^+$  du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. La channelrhodopsine, généralement activable par des rayonnements dont les longueurs d'ondes correspondent au bleu, est un canal ionique qui, lorsqu'il est activé, conduit à l'excitation ciblée de neurones [72]. Il s'agit également d'un canal ionique, mais qui contrairement à la halorhodopsine, fait entrer dans les neurones, lors de son activation,

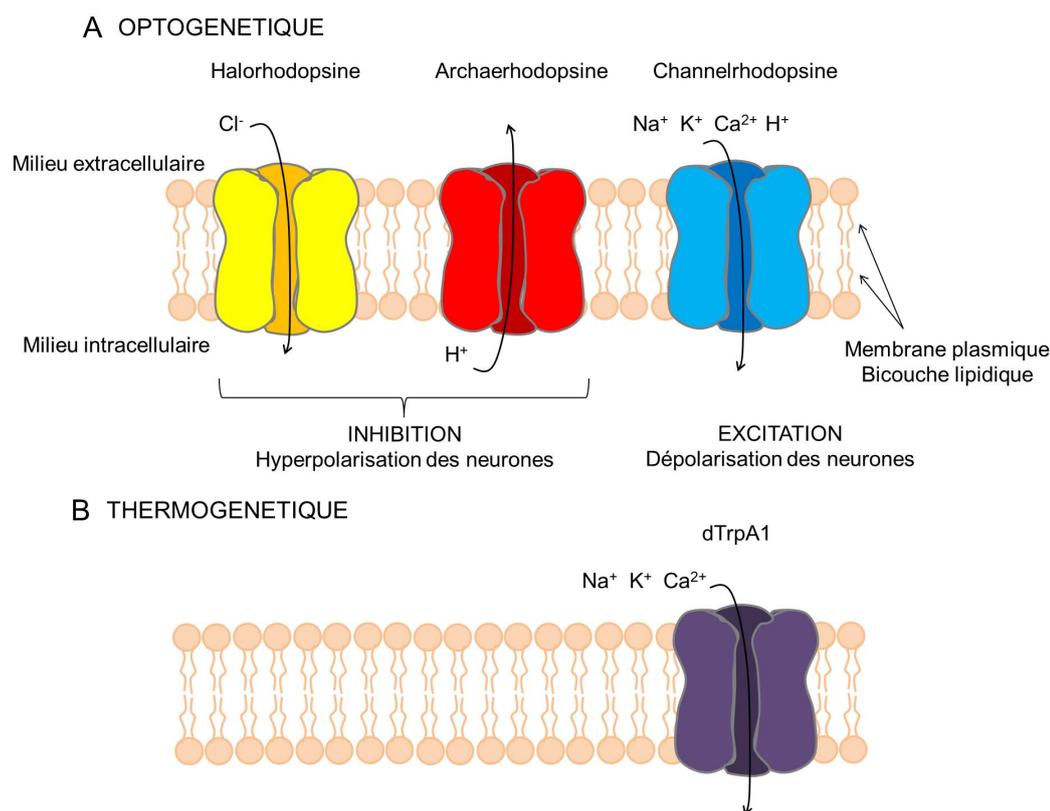


FIGURE 1.12 – Principaux outils opto- et thermogénétiques utilisés chez la drosophile pour le contrôle de l’activité neuronale. (A) Canaux ioniques sensibles à la lumière : Halorhodopsine, Archaeorhodopsine et Channelrhodopsine. (B) Canal ionique sensible à la température dTrpA1.

des cations tels que les ions potassium  $\text{K}^+$ , les ions sodium  $\text{Na}^+$ , les protons  $\text{H}^+$  ou les ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  conduisant à la dépolarisation des neurones ciblés. Très récemment, un canal ionique sensible à la lumière, nommé BACCS (pour “Blue light-Activated  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Switch”) et conduisant, après activation lumineuse, à l’entrée spécifique d’ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  a été développé [73].

Les outils optogénétiques qui ont été à la base développés chez les mammifères, ont également été introduits chez la drosophile [74]. Toutefois, l’utilisation de la lumière comme déclencheur de l’activité neuronale présente quelques limitations. Il peut par exemple être difficile de cibler, avec le faisceau lumineux d’activation, le groupement de neurones d’intérêt, si celui-ci se trouve en profondeur dans le cerveau. Pour les organismes modèles tels que les rongeurs, la stimulation optogénétique peut être délivrée à l’aide de fibres optiques ce qui n’est pas le cas de la drosophile. L’absorption du rayonnement par les tissus peut être compensée par l’utilisation de plus fortes densités de puissance lumineuse d’activation. Néanmoins, dans le contexte de l’imagerie *in vivo*, cette solution est peu recommandée si l’on veut pouvoir observer le comportement neuronal sans introduire trop de perturbations liées à des effets phototoxiques indésirables. Des effecteurs optogénétiques activables par des rayonnements de

plus grande longueur d'onde, typiquement dans le rouge, ont été développés afin de permettre l'activation de neurones situés en profondeur [75, 76, 77]. Le décalage de la longueur d'onde d'excitation, vers le rouge, des actuateurs optogénétiques, que cela soit pour l'excitation ou l'inhibition des neurones, permet également de s'éloigner de la fenêtre de sensibilité du système visuel de la drosophile, limitant ainsi les artefacts de non-spécificité de la réponse neuronale.

Des effecteurs optogénétiques fonctionnant sur le principe de décaage par photoactivation d'ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  ont également été développés, permettant l'activation neuronale dans des sous-compartiments cellulaires ciblés [78]. Le ciblage de sous-compartiments cellulaires est impossible avec des effecteurs optogénétiques de type canaux ioniques car ils sont ancrés à la membrane plasmique. Malgré tous ces développements, les outils optogénétiques étaient encore peu utilisés, il y a quelques années, chez la drosophile adulte car ils nécessitent d'introduire du rétinol, que les mammifères synthétisent naturellement, dans son alimentation. Ce co-facteur permet d'activer les rhodopsines bactériennes à la base des outils optogénétiques.

### 1.3.2.7 Thermogénétique : le contrôle de l'activité neuronale par la température

Le cerveau de la drosophile peut fonctionner correctement sur une gamme de température allant d'environ 17°C à 33°C. Ainsi les outils thermogénétiques, combinés avec le système d'expression UAS/GAL4, sont une alternative à l'optogénétique pour contrôler spécifiquement certains neurones, en inhibant ou en activant leur activité. Différents outils thermogénétiques existent chez la drosophile comme par exemple :

- l'utilisation du transgène UAS-Shibire<sup>ts</sup> [79] pour agir sur la transmission synaptique. A basse température (inférieure à 25°C), la transmission synaptique est normale alors qu'elle est bloquée pour des températures supérieures à 29°C par blocage du recyclage des vésicules synaptiques. Cet effet est réversible et permet donc de contrôler temporellement l'activité de la sous-population neuronale sélectionnée par le pilote d'expression GAL4 utilisé.
- l'utilisation du transgène UAS-dTrpA1 [80] pour dépolariser les neurones. Ce transgène code pour un canal ionique thermosensible. Lorsque la température est supérieure à 25°C, les neurones sont activés par entrée d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  dans le milieu intracellulaire (figure 1.12B).

La limitation principale des approches thermogénétiques en comparaison de l'optogénétique est la résolution temporelle si le chauffage se fait par convection avec le milieu environnant. Il est néanmoins possible de contrôler l'activation ou l'inhibition de l'activité neuronale par thermogénétique avec des temps caractéristiques inférieurs à la seconde en utilisant par exemple un faisceau laser infrarouge pour le chauffage sur une mouche immobile ou même sur une mouche en mouvement dans le cas de l'étude de la locomotion [81].

## 1.4 La préparation microchirurgicale de la drosophile pour l'imagerie *in vivo*

### 1.4.1 Le protocole de microchirurgie

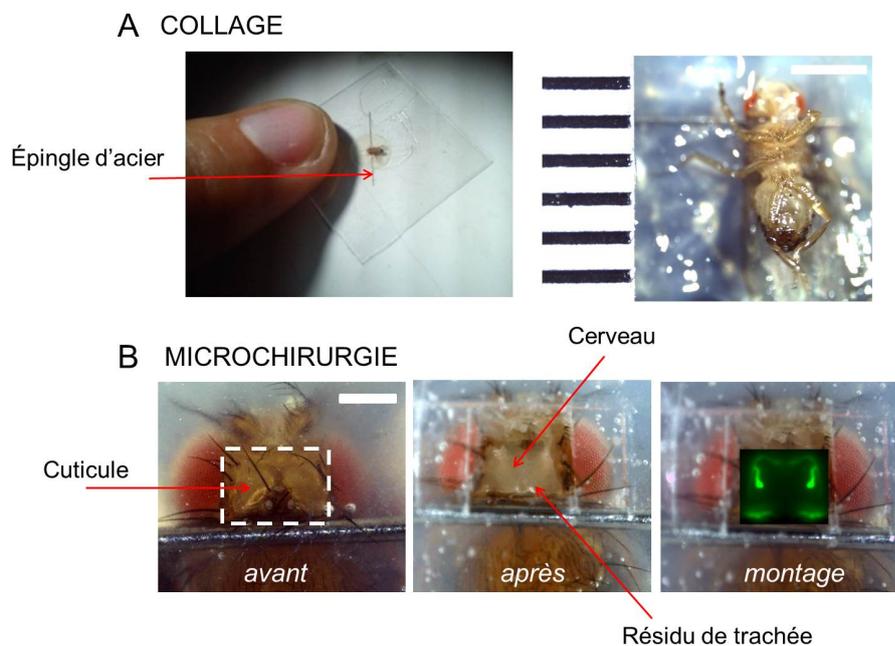


FIGURE 1.13 – Étapes de préparation de la drosophile à l'imagerie optique cérébrale *in vivo*. (A) Collage, sur une lamelle de plastique, de la drosophile sur le dos. La période des traits du régllet, à côté de la drosophile, est 500  $\mu\text{m}$ . Barre d'échelle : 1 mm. (B) Microchirurgie : ouverture de la cuticule. Sur la troisième photographie, est superposée une image prise en microscopie de fluorescence, permettant ainsi de visualiser comment sont orientés les corps pédonculés au sein du cerveau de la drosophile. Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

Afin de suivre optiquement l'activité cérébrale de la drosophile, il est nécessaire de créer un accès optique au cerveau. La cuticule de la drosophile étant fortement diffusante, une microchirurgie est réalisée sous loupe binoculaire afin de révéler le cerveau. Les étapes de la préparation de l'échantillon vivant sont présentées sur la figure 1.13. La drosophile est tout d'abord collée sur une lamelle en plastique, trouée en son centre, sans anesthésie préalable (figure 1.13A). La colle utilisée est une colle dentaire biocompatible (3M ESPE Protemp). Une épingle d'acier permet de maintenir la tête de la drosophile dans une position correcte. L'orientation de la tête est adaptée à la zone d'intérêt à imager afin de diminuer au maximum l'épaisseur de tissu traversée par la lumière. La seconde étape consiste à ouvrir la tête de la drosophile à l'aide de scalpels très fins afin de retirer une région rectangulaire de cuticule, de dimension 300  $\mu\text{m}$  par 400  $\mu\text{m}$ , qui recouvre le cerveau (figure 1.13B). Les trachées sous-jacentes ainsi que d'éventuelles cellules graisseuses sont également retirées. L'ensemble des gestes doit être extrêmement minutieux afin de ne pas endommager les cellules gliales qui entourent le cerveau. Ces cellules jouent le rôle de barrière hémato-encéphalique. Toutes les étapes de microchirurgie s'effectuent

en présence d'un liquide physiologique afin de préserver le cerveau. La composition de cette solution aqueuse, appelée solution de Ringer, est la suivante [82] : 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 36 mM C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (sucrose), 5 mM HEPES-NaOH (Sigma-Aldrich). Le pH de la solution est de 7.3.

### 1.4.2 La diminution des mouvements du cerveau

Les mouvements du cerveau de la mouche compliquent les expériences. Il est tout simplement impossible de suivre l'évolution de la fluorescence, témoin de l'activité neuronale, si l'échantillon présente de trop grandes variations de position. En effet, les mouvements ont pour conséquence des variations de la fluorescence mesurée, qui peuvent être de plus grandes amplitudes que le signal d'intérêt. Les mouvements ont lieu dans les trois directions de l'espace. Il peut également s'agir plus généralement d'une combinaison de translations et de déformations. En ce qui concerne les mouvements latéraux, il existe des techniques de réaligement post acquisition que je présenterai dans le Chapitre 4. En revanche, les mouvements dans la direction de l'axe optique ne peuvent pas être corrigés post acquisition si l'imagerie est réalisée uniquement dans un plan et non en trois dimensions. Une solution consiste à diminuer physiologiquement les mouvements du cerveau de la drosophile. Une des causes du mouvement est l'extension et la flexion du proboscis, organe couplé par des ligaments au cerveau, et que la mouche étend spontanément de temps en temps. Une technique consiste à sectionner le nerf du proboscis [83]. Cette technique est néanmoins extrêmement délicate à mettre en œuvre. Pour mes expériences, j'ai collé le proboscis de la mouche avec de la colle dentaire. Cependant, cela ne suffit pas à s'affranchir de la totalité des mouvements. Un gel d'agarose a été employé pour rendre le cerveau plus solidaire de l'enveloppe cuticulaire. Il existe de nombreux types d'agarose qui se différencient les uns des autres par leur température de fusion et de solidification. L'agarose traditionnellement utilisé pour ce type d'expérience se solidifie vers 40°C. Il est cependant contraignant pour des expériences où l'on cherche à observer des réponses fonctionnelles *in vivo* de verser un mélange chaud sur le cerveau. Il existe un type d'agarose qualifié de "low gelling temperature" (A9414, Sigma Aldrich) qui permet d'abaisser la température de solidification à environ 30°C évitant ainsi la surchauffe et l'éventuelle mort cellulaire. On peut également jouer sur la tenue mécanique et l'élasticité du gel d'agarose et sur sa température de solidification en faisant varier la concentration massique. J'ai utilisé typiquement des gels d'agarose de concentration massique 2 %. La goutte d'agarose déposée sur le cerveau permet de limiter ses mouvements mais sa mise en place est délicate car sa forme et sa taille peuvent apporter des aberrations optiques sur le chemin de l'excitation et de l'émission de la fluorescence et ainsi dégrader la qualité de l'imagerie.

### 1.4.3 La dissection par laser

Récemment, une équipe a mis au point une méthode de dissection des drosophiles par laser [84]. Le but est de fiabiliser la dissection en diminuant l'impact sur la drosophile d'une dissection mécanique manuelle, mais également de diminuer le temps de préparation de l'échantillon afin de faciliter les études statistiques. Cette méthode permet une diminution de la variabilité inter-individu ainsi qu'un temps de vie de la drosophile sous le microscope allongé jusque 18 heures,

ce qui est indispensable pour les expériences de mémorisation. Brièvement, la méthode consiste à vaporiser la cuticule de la drosophile à l'aide d'un laser excimère pulsé, émettant un rayonnement UV. Le faisceau laser est façonné grâce à l'utilisation de masques adaptés à la dimension de la cuticule à retirer. La précision de retrait de la cuticule en profondeur est meilleure que le micromètre, précision inégalable avec une dissection manuelle. Cette méthode est extrêmement prometteuse en terme de dynamique, de répétabilité et de précision de la dissection. Néanmoins, elle requiert l'utilisation d'un laser excimère très coûteux et n'a alors pas pu être mise en place et utilisée durant cette thèse.

### 1.5 Conclusion

La drosophile est un organisme modèle dans de très nombreux domaines et notamment en neurobiologie pour l'étude des processus de mémorisation. Les nombreux outils génétiques qui lui sont dédiés, dont seule une fraction a été décrite dans ce chapitre, associés au développement galopant de sondes fluorescentes encodées génétiquement font de la drosophile un modèle sans aucune commune mesure avec d'autres organismes tels que l'abeille ou la souris par exemple. Les sondes fluorescentes pour l'étude de l'activité cérébrale sont de plus en plus performantes et permettent d'accéder à des voies de signalisation diversifiées, avec une approche multi-échelle, du neurone au réseau neuronal. Afin d'exploiter au maximum les caractéristiques de ces sondes fluorescentes nouvellement développées, telles que la sonde calcique G-CaMP6f ou la sonde voltage ArcLight, une technique d'imagerie de grande qualité en terme de résolution spatiale, de sensibilité et de rapidité, doit être développée. Les Chapitres 2 et 3 correspondent à la mise en place d'un tel système de microscopie de fluorescence adapté à l'imagerie *in vivo* tridimensionnelle du cerveau de la drosophile, et en particulier à l'imagerie des corps pédonculés, neurones impliqués dans la formation de la mémoire associative olfactive.



# 2

## Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

### Sommaire

---

2.1	Microscopies optiques de fluorescence limitées par la diffraction . . . . .	35
2.1.1	Principes physiques : limite de diffraction et notion de sectionnement optique . . . . .	35
2.1.1.1	La limite de diffraction . . . . .	35
2.1.1.2	Le sectionnement optique . . . . .	37
2.1.2	La microscopie conventionnelle plein champ, rapide mais sans capacité de coupe optique . . . . .	37
2.1.3	Les microscopies de sectionnement optique à balayage . . . . .	38
2.1.3.1	La microscopie confocale, capable de sectionnement optique mais à faible cadence d'acquisition . . . . .	38
2.1.3.2	La microscopie multiconfocale, alliance de la résolution et de la vitesse . . . . .	38
2.1.3.3	La microscopie non linéaire de type biphotonique, l'accès à la profondeur . . . . .	40
2.1.4	Les microscopies de sectionnement optique plein champ . . . . .	41
2.1.4.1	La microscopie à feuille de lumière . . . . .	41
2.1.4.2	La microscopie à illumination structurée . . . . .	42
2.2	La microscopie à illumination structurée de type HiLo . . . . .	43
2.2.1	Les fréquences spatiales . . . . .	43

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

---

2.2.2	Le principe de la microscopie à illumination structurée . . . . .	43
2.2.3	Microscopie HiLo et algorithme de reconstruction des images. . . . .	46
2.2.3.1	Principe de réalisation du sectionnement optique plein champ HiLo . . . . .	46
2.2.3.2	L'algorithme de reconstruction de la section optique . . . . .	47
2.2.4	Le dispositif expérimental pour la microscopie HiLo . . . . .	52
2.2.4.1	Le montage optique . . . . .	52
2.2.4.2	La matrice de micro-miroirs . . . . .	53
2.2.4.3	La synchronisation du dispositif et la réalisation de coupes optiques HiLo . . . . .	58
2.2.5	Caractérisation du microscope à illumination structurée . . . . .	59
2.2.5.1	Évaluation de la réponse impulsionnelle . . . . .	60
2.2.5.2	Réponse fréquentielle du microscope . . . . .	63
2.2.5.3	Capacité de coupe optique . . . . .	65
2.2.5.4	Réjection des basses fréquences spatiales hors mise au point . . . . .	67
2.3	Résultats : Microscopie Hilo pour l'imagerie <i>in vivo</i> du cerveau de la drosophile	<b>68</b>
2.3.1	Lignées transgéniques de drosophiles . . . . .	69
2.3.2	La capacité de sectionnement optique de la microscopie HiLo . . . . .	69
2.3.3	Microscopie plein champ HiLo et microscopie confocale à balayage . . . . .	71
2.3.4	Adaptation de la fréquence spatiale du motif d'illumination pour l'imagerie HiLo tridimensionnelle. . . . .	73
2.4	Discussion . . . . .	<b>75</b>
2.4.1	La microscopie HiLo, une technique de coupe optique plein champ limitée par diffraction . . . . .	75
2.4.2	Choix du motif d'illumination et des paramètres de reconstruction de la microscopie HiLo . . . . .	77
2.4.3	Le sectionnement optique de la microscopie HiLo en profondeur . . . . .	80
2.5	Conclusion . . . . .	<b>81</b>

---

Le développement constant et rapide des sondes fluorescentes génétiquement encodées a fait de la microscopie de fluorescence une technique de choix pour l'imagerie fonctionnelle neurobiologique. Elle permet de suivre, à cet effet, de nombreuses voies de signalisation, de manière multispectrale, en ciblant spécifiquement des régions d'intérêt, comme des sous-populations de neurones ou des sous-compartiments cellulaires par exemple. La technique de microscopie de fluorescence adaptée à l'imagerie *in vivo* cérébrale de la drosophile doit posséder certaines qualités. Elle doit être rapide, sensible et présenter une capacité de coupe optique efficace afin de pouvoir suivre, en temps "réel" et en trois dimensions, des réponses fonctionnelles à des stimulations. Dans ce chapitre je présente, de manière non exhaustive, les techniques de microscopie de fluorescence conventionnellement utilisées dans ce domaine, à savoir les microscopies plein champ et les microscopies à balayage de type confocale ou biphotonique. Je présenterai également des techniques d'imagerie plus récemment développées, comme la microscopie multi-confocale et la microscopie à feuille de lumière. Enfin, la microscopie à illumination structurée,

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

de type HiLo, qui est la technique que nous avons mise en œuvre pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile sera exposée. Ses performances, spatiales et temporelles, seront caractérisées et des résultats d'imagerie morphologique dans les corps pédonculés de la drosophile seront présentés. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication qui est donnée dans l'annexe C.

### 2.1 Microscopies optiques de fluorescence limitées par la diffraction

#### 2.1.1 Principes physiques : limite de diffraction et notion de sectionnement optique

##### 2.1.1.1 La limite de diffraction

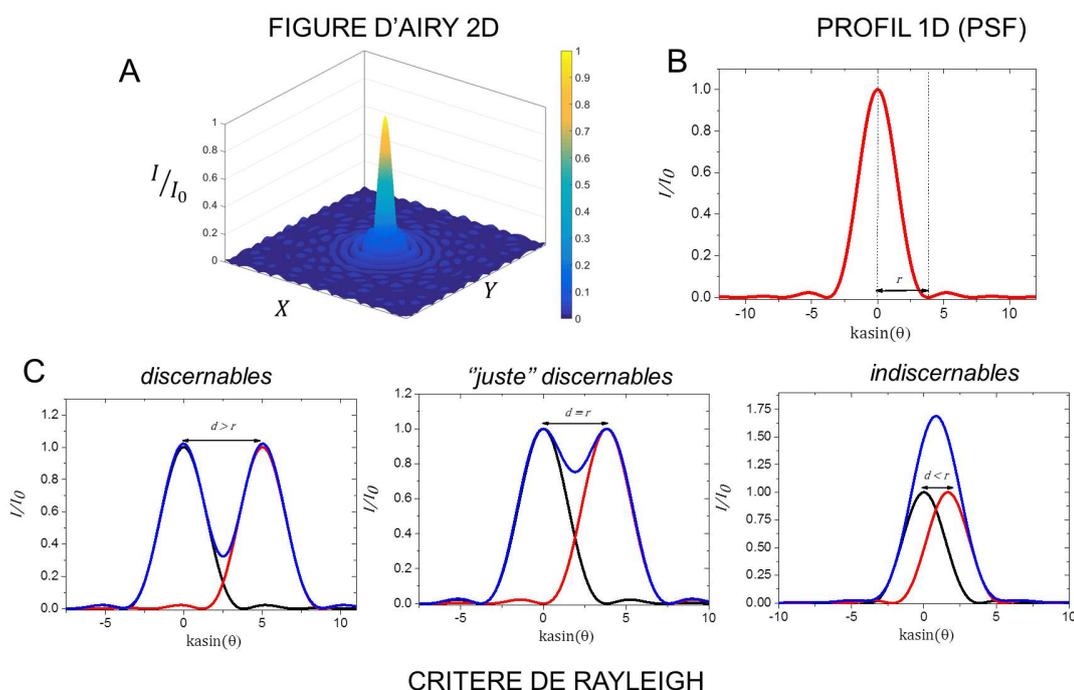


FIGURE 2.1 – Illustration de la limite de diffraction et du pouvoir de résolution d'un microscope optique. (A) Représentation bidimensionnelle de la figure de diffraction, appelée figure d'Airy, pour une pupille circulaire. (B) Profil unidimensionnel de la figure d'Airy. (C) Illustration du pouvoir de résolution : les courbes noires et rouges correspondent aux profils d'intensité enregistrés pour deux sources ponctuelles, et les courbes bleues correspondent à la somme des intensités de ces deux objets. Trois cas sont présentés :  $d > r$ ,  $d = r$  et  $d < r$  où  $d$  est la distance entre les deux sources et  $r$  est le rayon de la tache d'Airy.

La résolution de tous les microscopes optiques conventionnels présente une limite fondamentale imposée par la diffraction due au caractère ondulatoire de la lumière. La microscopie de superrésolution, dont le développement a valu le prix Nobel de Chimie 2014 à E. Betzig,

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

---

W. E. Moerner et S. Hell, vise à dépasser cette limite, soit en façonnant le faisceau d'excitation [6] (STED pour Stimulated Emission Depletion), soit en activant séquentiellement les fluorophores présents dans l'échantillon [4] (PALM pour Photoactivated Localization Microscopy, ou STORM pour Stochastic Optical Reconstruction Microscopy). Les techniques de nanoscopie représentent l'une des grandes évolutions pour les années à venir mais il y a encore peu d'applications *in vivo* en neurobiologie jusqu'à présent. Ces études concernent principalement les épines dendritiques des neurones [86]. Les principales limitations de ces techniques pour leur application à l'imagerie du vivant est leur faible rapport signal sur bruit, la difficulté de les utiliser en profondeur dans des tissus biologiques, leur faible dynamique temporelle (pour les mises en œuvre dans des systèmes de microscopies de type PALM ou STORM), et l'utilisation de fortes puissances laser (notamment pour la microscopie STED). Je ne traiterai pas ici de microscopie de superrésolution mais développerai plus particulièrement les microscopies optiques de fluorescence limitées par la diffraction. L'image d'un objet ponctuel n'est pas ponctuelle mais consiste en un motif de diffraction, appelé figure d'Airy (figures 2.1A et B) pour des pupilles circulaires, ce qui est le cas des objectifs de microscope utilisés. La figure d'Airy obtenue est une figure d'interférence qui constitue la réponse impulsionnelle du microscope autrement appelée fonction d'étalement du point (l'appellation plus couramment utilisée est PSF pour "Point Spread Function"). Ainsi, deux objets très proches l'un de l'autre spatialement, séparés d'une distance  $d$  ne seront effectivement perçus comme deux objets distincts, selon le critère de Rayleigh, que si  $d$  est supérieure ou égale au rayon  $r$  de la tache d'Airy qui correspond à l'anneau central de la figure de diffraction (figure 2.1C). La résolution latérale d'un microscope optique est identifiée au rayon  $r$  de la tache d'Airy qui s'exprime en fonction de la longueur d'onde de la lumière  $\lambda$  et de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope sous la forme :

$$r = \frac{1.22\lambda}{2ON}. \quad (2.1)$$

L'ouverture numérique d'un objectif est définie comme  $n \sin \phi$  où  $n$  est l'indice de réfraction du milieu d'immersion et  $\phi$  le demi angle du cône de lumière capturé par l'objectif. Plus l'ouverture numérique de l'objectif  $ON$  est grande et plus la longueur d'onde de la lumière utilisée est faible, meilleure est la résolution du microscope. Mathématiquement, la figure d'Airy, en termes d'intensité sur le détecteur, a pour expression en coordonnées polaires :

$$I(\theta) = I_0 \times \left( \frac{J_1(ka \sin \theta)}{ka \sin \theta} \right)^2, \quad (2.2)$$

où  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ ,  $a$  est le rayon de la pupille circulaire de l'objectif et  $J_1$  est la fonction de Bessel du premier ordre. Ces considérations ne sont valides que dans un microscope parfait sans aberration optique. La formation d'une image bidimensionnelle  $Image(x, y)$  dans un microscope optique consiste en la convolution de l'objet et de la fonction d'étalement du point. L'image résultante est la somme de tous les plans de l'échantillon. Le sectionnement optique consiste à s'affranchir de cette sommation.

$$Image(x, y) = \int Object(x, y, z) \otimes PSF(x, y; z) dz. \quad (2.3)$$

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

### 2.1.1.2 Le sectionnement optique

Le sectionnement optique est la capacité d'un microscope à produire des images nettes à des profondeurs d'observation bien précises dans un échantillon épais. Cette capacité est utilisée en remplacement de la coupe mécanique de l'échantillon en fines tranches par microtomie. Le sectionnement mécanique est extrêmement laborieux et exclut toute possibilité d'imagerie *in vivo*. Ainsi, une capacité de sectionnement optique efficace, qui correspond à une bonne résolution axiale, permettra une imagerie tridimensionnelle par juxtaposition des images enregistrées à différentes profondeurs dans l'échantillon.

Les premiers microscopes utilisés pour les études dans le domaine de la neurobiologie étaient des microscopes plein champ sans capacité de sectionnement optique. Ils ont ensuite cédé leur place à des microscopes confocaux à balayage capables de sectionnement optique. Ces derniers souffraient toutefois à leur début d'une faible résolution temporelle en raison de l'acquisition point par point, peu adaptée à l'imagerie *in vivo*. Des améliorations technologiques ont alors conduit à deux grands types de microscopies alliant résolution et rapidité : soit une parallélisation de la microscopie confocale, soit le développement de techniques plein champ avec un façonnage du faisceau d'excitation (microscopies à feuille de lumière ou à illumination structurée).

### 2.1.2 La microscopie conventionnelle plein champ, rapide mais sans capacité de coupe optique

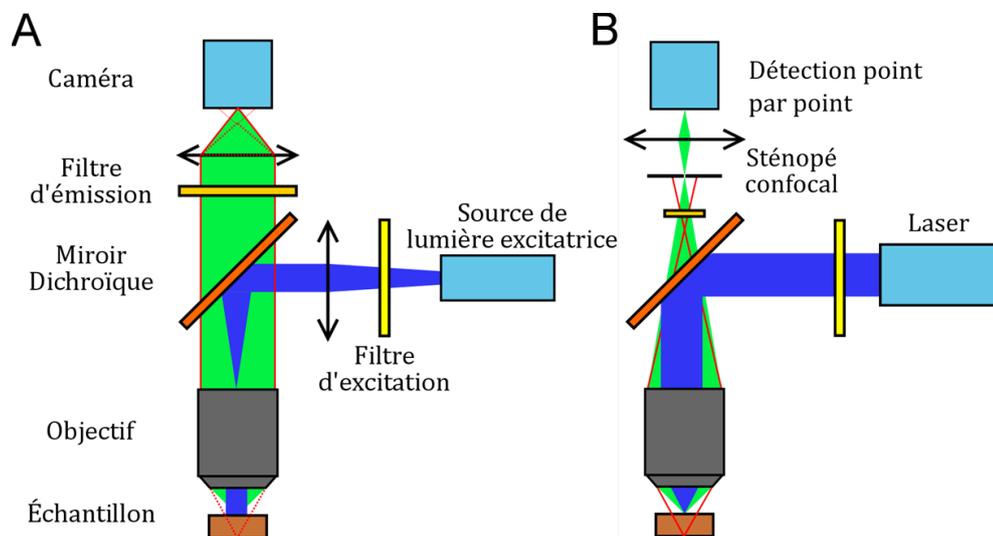


FIGURE 2.2 – Schématisation de microscope optique plein champ standard et confocal, en configuration d'épifluorescence. (A) Microscope plein champ standard. (B) Microscope confocal.

La configuration la plus commune en microscopie plein champ optique est un montage en épifluorescence, c'est-à-dire où la fluorescence, qui est récoltée, est émise en direction opposée de l'excitation (figure 2.2A). Les voies d'excitation et d'émission sont séparées spectralement grâce à un miroir dichroïque. Dans ce type de microscope, un grand volume de l'échantillon est

illuminé par le faisceau d'excitation. Ainsi, la fluorescence provenant de toute la zone éclairée, et notamment de toute l'épaisseur de l'échantillon, est détectée. Sur l'image résultante vont alors se superposer des contributions provenant de plans hors mise au point. Plus l'échantillon à observer est épais, plus ce défaut d'absence de sectionnement optique va devenir limitant rendant impossible l'imagerie d'une profondeur d'observation précise dans l'échantillon. Une amélioration peut être apportée à l'imagerie plein champ conventionnelle en déconvoluant les images par la fonction d'étalement du point. Néanmoins, cette méthode nécessite la connaissance précise de la fonction d'étalement du point du microscope [87]. Dans le cas d'un échantillon épais comme le cerveau de la drosophile, cette technique est difficilement applicable car la fonction d'étalement du point dépend de la position imagée dans l'échantillon et est difficilement mesurable et reproductible d'un échantillon à l'autre. Il est donc nécessaire pour améliorer la résolution spatiale du microscope d'être capable de discerner les photons de fluorescence provenant du plan de mise au point de ceux émis à partir des plans hors mise au point. Une autre approche pour rétablir une capacité de sectionnement optique est la microscopie confocale.

### 2.1.3 Les microscopies de sectionnement optique à balayage

#### 2.1.3.1 La microscopie confocale, capable de sectionnement optique mais à faible cadence d'acquisition

La microscopie confocale utilise un trou de filtrage en amont du capteur de la caméra (figure 2.2B) [88]. Ce trou de filtrage est conjugué optiquement avec le plan de mise au point de l'objectif afin de ne sélectionner spatialement que la fluorescence provenant de ce plan. Ainsi, seule une très faible portion des photons provenant des plans hors mise au point sera transmise par le trou de filtrage ce qui confère à la microscopie confocale une capacité de sectionnement optique. La taille du trou détermine l'épaisseur de la section imagée. L'excitation et l'acquisition des images se font point par point par balayage de l'échantillon ou du faisceau d'excitation laser dans les trois dimensions de l'espace. Cette caractéristique intrinsèque de la microscopie confocale lui confère une faible vitesse d'acquisition. Ainsi, pour une image  $512 \times 512$  pixels, le modèle de microscope confocal Olympus FluoView FV1000 a une cadence d'acquisition limitée par le balayage à environ 1 Hz. Le balayage du faisceau d'excitation est réalisé à l'aide de miroirs montés sur des actuateurs galvanométriques par exemple. La vitesse de balayage peut être accrue en remplaçant les miroirs galvanométriques par des éléments non mécaniques comme des modules acousto-optiques [89, 90]. Néanmoins, une limitation persiste : chaque zone de focalisation étant illuminée très peu de temps, typiquement quelques microsecondes, l'illumination laser doit être intense pour récolter suffisamment de photons de fluorescence ce qui peut entraîner du photoblanchiment et de la phototoxicité. Une parallélisation de plusieurs faisceaux d'excitation peut alors permettre d'augmenter la dynamique d'acquisition tout en conservant la capacité de sectionnement optique indispensable à l'imagerie d'échantillons épais.

#### 2.1.3.2 La microscopie multiconfocale, alliance de la résolution et de la vitesse

La microscopie multiconfocale permet de réaliser une imagerie résolue spatialement à plus grande vitesse que la traditionnelle microscopie confocale à balayage en parallélisant l'excitation. L'élément central du microscope est le disque de Nipkow inventé par Paul Nipkow en

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

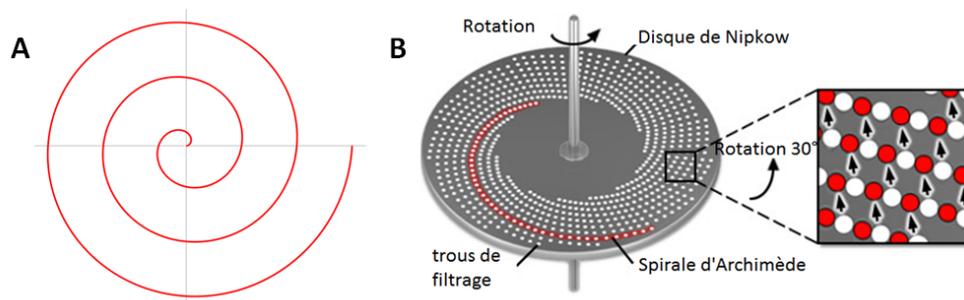


FIGURE 2.3 – Principe de balayage multiconfocal de l'échantillon assuré par la rotation du disque de Nipkow. (A) Représentation de la spirale d'Archimède selon laquelle sont organisés les trous sur le disque de Nipkow. (B) Principe de balayage multiconfocal de l'échantillon assuré par la rotation du disque de Nipkow. La figure est adaptée du site Zeiss.

1884 puis implémenté par David Egger et Mojmír Petráň en 1967 dans le premier microscope multiconfocal de type “spinning disk”. Ce disque est constitué d'un arrangement en spirales de milliers de trous espacés les uns des autres d'une distance constante. La version la plus récente du microscope multiconfocal “spinning disk” utilise une paire de disques. Un premier disque est constitué de milliers de micro-lentilles disposées selon la spirale d'Archimède, représentée sur la figure 2.3A, qui permettent de focaliser le faisceau laser d'excitation sur un second disque, composé de trous de filtrage en regard des micro-lentilles du premier disque. Ces trous de filtrage sont conjugués optiquement avec le plan de l'échantillon. A un instant donné, seule une fraction des trous est illuminée. L'illumination de l'ensemble de l'échantillon est assurée par la rotation des disques (figure 2.3B). Les différents trous parcourent alors des arcs concentriques balayant l'échantillon. La fluorescence émise par l'échantillon est filtrée par les mêmes trous du disque de Nipkow que ceux traversés par le faisceau d'excitation. Cette approche est cohérente car la vitesse de rotation du disque est incomparablement plus faible que la vitesse de la lumière. Les trous de filtrage permettent, comme dans un microscope confocal traditionnel, de bloquer la lumière provenant des plans hors mise au point afin de réaliser le sectionnement optique. Néanmoins, la parallélisation du balayage peut dégrader un peu la qualité du sectionnement optique du fait de photons hors plan de mise au point pouvant atteindre le détecteur en passant par les trous de filtrage voisins. Cet effet est connu sous l'appellation “pinhole crosstalk”. L'image finale est obtenue lorsque l'ensemble de l'échantillon a été illuminé. Le microscope multiconfocal de type “spinning disk” allie donc deux qualités : une capacité de sectionnement optique et une grande vitesse d'acquisition. Une des limitations, dans le cas de l'imagerie d'échantillons épais, est son manque de flexibilité avec une taille de trous fixe contrairement à la microscopie confocale traditionnelle. Ainsi, la sensibilité sera dégradée pour l'imagerie en profondeur dans le cas d'échantillons aberrants optiquement. L'utilisation de la microscopie multiconfocale pour l'imagerie des corps cellulaires des neurones des corps pédonculés de la drosophile sera traitée plus en détail au Chapitre 4. De plus, cette technique, comme la microscopie confocale, consiste à illuminer l'échantillon sur toute sa profondeur et ensuite à ne conserver par filtrage spatial que les photons provenant de la section d'intérêt. Pour les échantillons biologiques, des effets de photoblanchiment et/ou de phototoxicité peuvent être limitant suivant la puissance d'ex-

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

citation lumineuse utilisée. Il peut alors être intéressant d'utiliser une interaction non linéaire entre la lumière et l'échantillon pour exciter la fluorescence. Cette microscopie est connue sous le nom de microscopie biphotonique. Il s'agit aussi d'une technique à balayage point à point.

### 2.1.3.3 La microscopie non linéaire de type biphotonique, l'accès à la profondeur

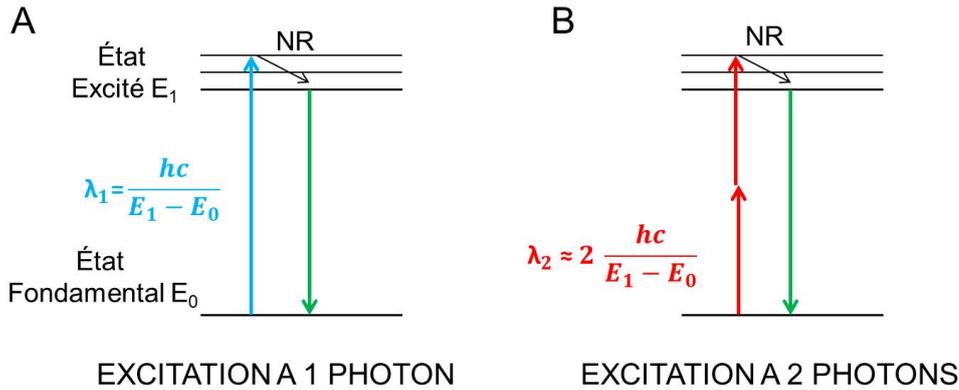


FIGURE 2.4 – Diagramme de niveaux d'énergie simplifié dans les cas d'excitation de la fluorescence à un ou deux photons. (A) Excitation monophotonique. (B) Excitation biphotonique.  $\lambda_2 \simeq 2\lambda_1$  car la longueur d'onde d'excitation et l'énergie nécessaire à la transition sont inversement proportionnelles. NR correspond à un processus non radiatif.

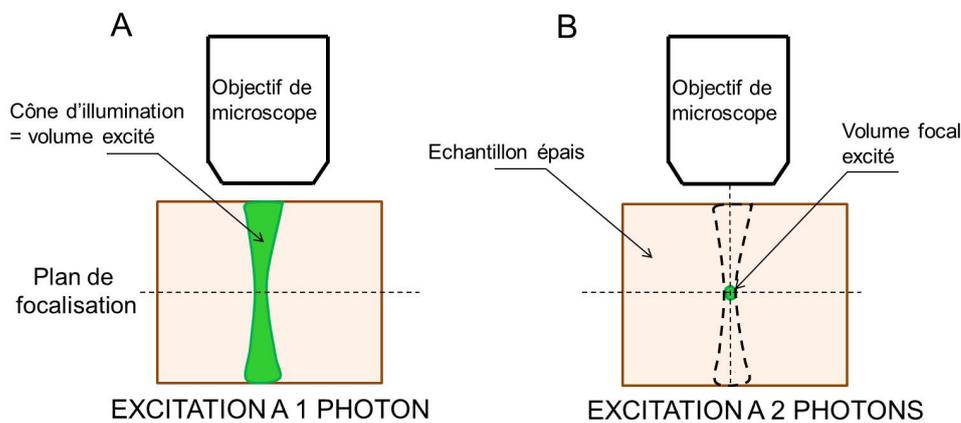


FIGURE 2.5 – Schématisation de la zone d'excitation au sein d'un échantillon fluorescent épais dans les cas de l'excitation à un ou deux photons. (A) Excitation monophotonique. (B) Excitation biphotonique.

La microscopie biphotonique se base sur un processus physique non linéaire d'absorption "simultanée" de deux photons par le fluorophore. Ce processus a été prévu théoriquement en 1931 par Maria Göppert-Mayer mais il ne fut appliqué à la microscopie que bien plus tard [91] grâce au développement technologique des lasers. Les photons absorbés ont environ la moitié de l'énergie requise pour assurer la transition du niveau fondamental au premier état excité

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

---

(figure 2.4). La fluorescence émise par le fluorophore est la même que si celui-ci avait été excité par un processus d'absorption à un seul photon. La section efficace d'absorption à deux photons est plus faible que celle à un photon, même si pour la molécule de EGFP cet écart n'est pas dramatique [92]. Les conditions nécessaires à l'absorption biphotonique sont une très haute densité de photons d'un point de vue spatial et temporel pour assurer une bonne efficacité d'absorption simultanée de deux photons par le fluorophore. Ainsi, les sources d'excitation principalement utilisées pour l'excitation biphotonique sont des lasers intenses impulsionnels émettant dans le proche infrarouge, de durée d'impulsion de l'ordre de quelques dizaines de femtosecondes : typiquement il s'agit souvent de laser dont l'élément amplificateur est un cristal de saphir dopé avec des ions titane. L'absorption à deux photons dépend de manière quadratique de l'intensité de la lumière excitatrice. Ainsi, le volume excité sera restreint où le faisceau laser est le plus focalisé, limitant spatialement les effets de photoblanchiment et de phototoxicité (figure 2.5). Néanmoins, l'utilisation de lasers pulsés de haute puissance peut conduire à un échauffement de l'échantillon limitant les bienfaits en termes de phototoxicité du confinement de l'excitation. Cette caractéristique de confinement de l'excitation rend toutefois la microscopie biphotonique intrinsèquement confocale, sans nécessité d'utiliser un trou de filtrage. En effet, au contraire de la microscopie confocale où les photons ne provenant pas du plan focal sont filtrés, l'excitation biphotonique ne produit de la fluorescence qu'au niveau du volume focal, assurant ainsi un sectionnement optique direct. Typiquement, pour exciter des fluorophores de type EGFP, la longueur d'onde optimale d'excitation à deux photons est environ de 930 nm contre 490 nm pour l'excitation linéaire à un photon [93]. Ce décalage des longueurs d'onde vers le rouge va permettre d'imager plus en profondeur car la lumière excitatrice sera moins diffusée et absorbée par les plans de l'échantillon hors mise au point [94]. De plus, la gamme de longueur d'onde pour l'excitation à deux photons est moins invasive pour les tissus biologiques car elle correspond à la "fenêtre thérapeutique", région spectrale typiquement entre 700 nm et 1  $\mu\text{m}$  dans laquelle l'absorption des tissus biologiques est minimale. Malgré tous les avantages de la microscopie biphotonique présentés précédemment, cette technique souffre de la même limitation que la microscopie confocale car la seule différence entre ces deux types de microscopie est le processus d'excitation de la fluorescence. Un balayage point par point de l'échantillon est nécessaire pour recréer des sections optiques bidimensionnelles, puis un balayage axial afin de reconstruire une image tridimensionnelle de l'échantillon. Afin de s'affranchir de ce temps de balayage, des techniques de microscopie plein champ et capables de sectionnement optique, comme la microscopie à feuille de lumière ou la microscopie à illumination structurée, ont été développées.

### 2.1.4 Les microscopies de sectionnement optique plein champ

#### 2.1.4.1 La microscopie à feuille de lumière

La microscopie à feuille de lumière (SPIM pour "Selective Plane Illumination Microscopy") permet de dépasser les limitations temporelles inhérentes aux techniques de microscopies à balayage telles que les microscopies confocale ou biphotonique présentées précédemment. Cette microscopie présente néanmoins une capacité de sectionnement optique. Au contraire de la microscopie plein champ conventionnelle, seule une "tranche" de l'échantillon de faible

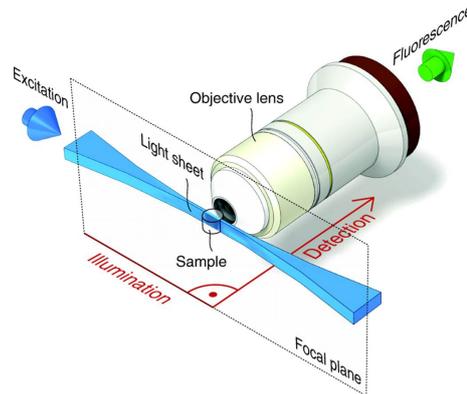


FIGURE 2.6 – Principe de la microscopie optique à feuille de lumière. L'axe d'illumination (flèche bleue) est orthogonal à l'axe de détection (flèche verte). Cette figure est extraite de [95].

épaisseur (quelques centaines de nanomètres à quelques microns) est illuminée par le faisceau d'excitation. Cette excitation se fait traditionnellement dans une direction perpendiculaire à la direction d'observation de la fluorescence (figure 2.6). La feuille de lumière est obtenue en focalisant le faisceau laser d'excitation dans une seule direction grâce à une lentille cylindrique. À la différence de la microscopie confocale, où l'excitation est étendue et un trou est utilisé pour s'affranchir des photons indésirables provenant des plans hors mise au point, la capacité de sectionnement optique de la microscopie à feuille de lumière provient de l'excitation localisée d'une tranche de l'échantillon. Comme seule la profondeur d'observation souhaitée est illuminée, cette technique permet en outre de limiter le photoblanchiment et la phototoxicité induits par une trop forte exposition de l'échantillon biologique à des rayonnements. Cette microscopie reste toutefois presque exclusivement adaptée à des échantillons ou animaux transparents (comme la larve de poisson zèbre [95, 96], ou rendus transparents [97]). Cette technique, qui dans son implémentation la plus courante, nécessite l'utilisation de deux objectifs de microscopes disposés dans des directions orthogonales, n'est pas facilement applicable à l'imagerie neurobiologique de la drosophile car cela nécessiterait d'avoir accès au cerveau par deux ouvertures. De récents développements [98] ont également montré que l'emploi d'un seul objectif pour la microscopie à feuille de lumière est envisageable en utilisant une feuille de lumière oblique. Néanmoins, cette configuration limite le champ de vue qui peut être imagé du fait de l'angle entre le plan de fluorescence et le plan de la caméra. Cet angle introduit un défaut de mise au point important pour les régions éloignées de l'axe optique. Cette technique rencontre en outre la même difficulté que la microscopie à feuille de lumière implémentée avec deux objectifs de microscope : lorsque la traversée de l'échantillon introduit beaucoup d'aberrations optiques, l'épaisseur de la feuille de lumière augmente ce qui dégrade la qualité de la coupe optique résultante.

### 2.1.4.2 La microscopie à illumination structurée

La microscopie à illumination structurée est une méthode permettant de réaliser des coupes optiques plein champ de l'échantillon tout en ne demandant que peu de modifications par rapport à un microscope plein champ conventionnel [99]. Dans cette méthode, l'échantillon est illuminé avec un faisceau d'intensité structurée spatialement, dont le contraste est rendu

maximal au niveau du plan que l'on souhaite imager. Cette structuration joue le rôle de porteuse optique. Les photons provenant de cette section pourront alors, grâce à la signature spectrale de la porteuse optique, être discernés des photons provenant des plans défocalisés. Des détails sur le fonctionnement de la microscopie à illumination structurée sont présentés dans la section suivante.

## 2.2 La microscopie à illumination structurée de type HiLo

Le but de cette section est de détailler plus particulièrement la microscopie plein champ à illumination structurée et notamment la technique HiLo, d'en expliquer le principe en se basant sur l'optique de Fourier, de présenter le dispositif expérimental développé dans le groupe [85] et d'en caractériser les performances en termes de résolution spatiale et de rapidité.

### 2.2.1 Les fréquences spatiales

Toute image peut être décomposée en une série de structures périodiques, de différentes fréquences spatiales, amplitudes et phases, qui se superposent. Ces séries de structures sont appelées composantes fréquentielles de l'image. Les images sont constituées à la fois de hautes et de basses fréquences spatiales. Qualitativement, les hautes fréquences spatiales correspondent à des variations spatiales rapides d'intensité dans l'image comme des contours ou des détails fins. Au contraire, les basses fréquences spatiales caractérisent les variations lentes d'intensité au sein de l'image. Pour reconstruire une image optique de bonne qualité d'un plan de l'échantillon, il faut avoir accès aux informations à la fois des basses et hautes fréquences spatiales. Cette notion est illustrée sur la figure 2.7. Le contenu fréquentiel d'une image est obtenu par transformée de Fourier. La transformée de Fourier inverse permet de retrouver l'image originelle. L'application dans le domaine fréquentiel d'un filtre passe-bas fait disparaître les contours (figure 2.7E) qui sont au contraire mis en valeur dans le cas de l'utilisation d'un filtre passe-haut (figure 2.7G).

### 2.2.2 Le principe de la microscopie à illumination structurée

Le point essentiel, à la base du principe de la microscopie à illumination structurée, est la transmission différente des différentes fréquences spatiales avec la défocalisation dans un système optique. Un parallèle peut être fait avec la photographie. En effet, si le photographe prend un cliché de bonne qualité, l'image est nette (figure 2.8A). Si maintenant, il y a un défaut de mise au point de l'objet photographié, la photographie résultante est "floue", il manque les détails et contours des objets (figure 2.8B). Ainsi, un défaut de mise au point affecte plus fortement les composantes hautes fréquences spatiales que les basses fréquences spatiales. La figure 2.9 montre l'évolution du profil d'intensité d'une grille à fréquence variable pour différentes positions du plan de mise au point, la grille étant placée dans le plan de référence  $z = 0$ . Les basses et hautes fréquences spatiales sont respectivement à gauche et à droite de l'image de référence prise dans le plan de focalisation. Il est à noter qu'ici la notion de basses et de hautes fréquences spatiales n'est abordée que de manière qualitative sans comparaison à une valeur de

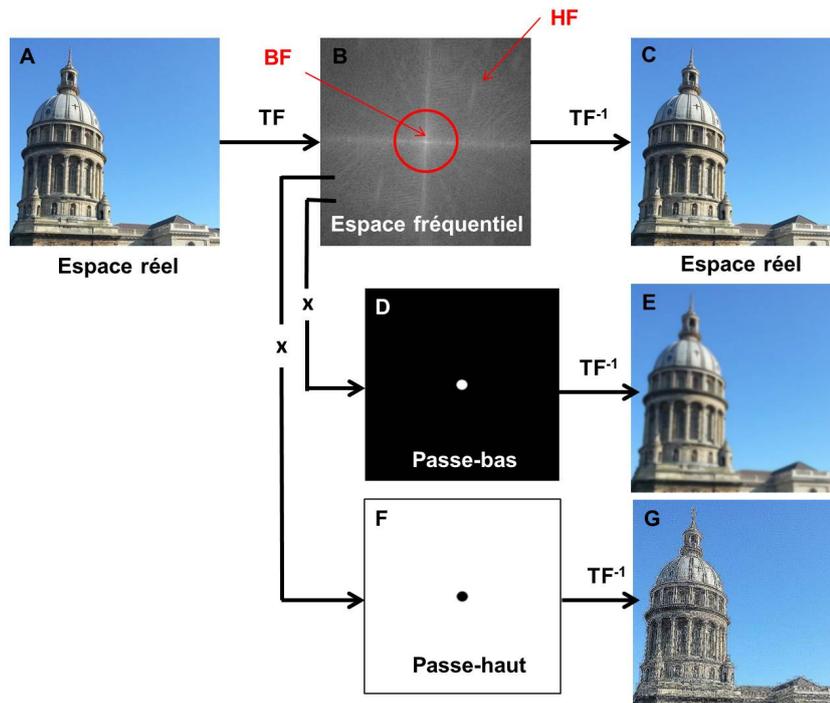


FIGURE 2.7 – Illustration de l’application de filtres fréquentiels passe-bas et passe-haut sur une image. (A) Image originelle dans le domaine spatial. (B) Image montrée en (A) dans le domaine fréquentiel. Pour information, la composante de fréquence nulle se trouve au centre du diagramme. (C) Image montrée en (B) dans le domaine spatial. (D) Filtre fréquentiel passe-bas. (E) Image obtenue, dans le domaine spatial, par multiplication du filtre passe-bas et de l’image montrée en (B). (F) Filtre fréquentiel passe-haut. (G) Image obtenue, dans le domaine spatial, par multiplication du filtre passe-haut et de l’image montrée en (B). BF : Basses Fréquences spatiales. HF : Hautes Fréquences spatiales. TF : Transformée de Fourier,  $TF^{-1}$  : Transformée de Fourier inverse.

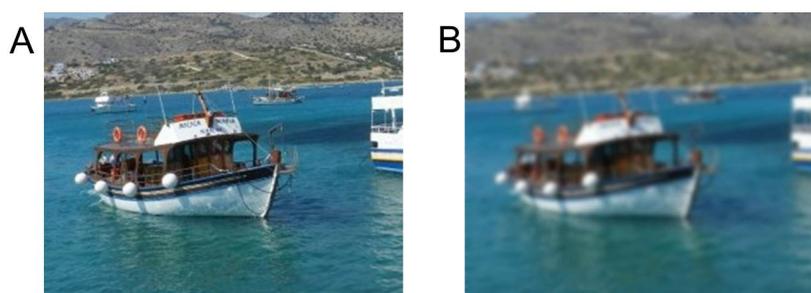


FIGURE 2.8 – Illustration du défaut de mise au point sur une image. (A) Image nette. (B) Image présentant un défaut de mise au point.

référence. On peut tout d’abord remarquer que l’intensité des composantes hautes fréquences spatiales diminue très rapidement avec la défocalisation tandis que la transmission des composantes basses fréquences spatiales n’est que faiblement affectée malgré le défaut de mise au point. Ainsi, lors de l’imagerie d’un plan donné dans un échantillon épais, les composantes

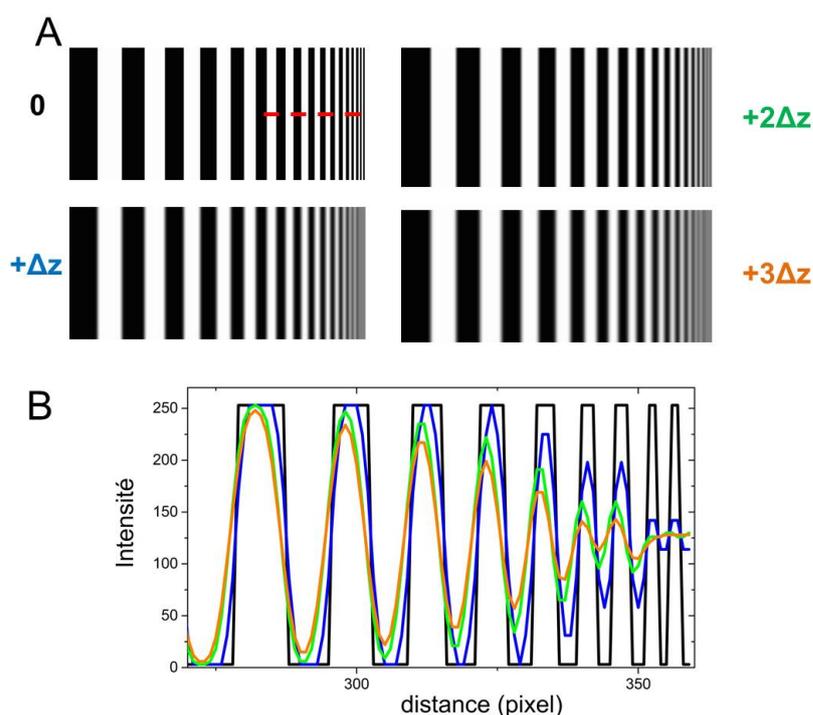


FIGURE 2.9 – Évolution du profil d’intensité d’une mire de fréquence variable avec la défocalisation. (A) Images de la grille pour différentes valeurs de défocalisation : 0 qui correspond au plan de mise au point,  $+\Delta z$ ,  $+2\Delta z$  et  $+3\Delta z$ . (B) Profils d’intensité pour les quatre valeurs de défocalisation. Le code couleur est celui présenté en (A). Les profils sont tracés suivant la ligne pointillée représentée sur l’image (A) sans défocalisation.

basses fréquences spatiales des plans hors mise au point vont contribuer au signal bidimensionnel récolté. Ce phénomène a pour conséquence une absence de sectionnement optique qui est la principale limitation des microscopes plein champ conventionnels. Dans l’image résultante se superposent les basses fréquences spatiales provenant du plan imagé, mais également les basses fréquences spatiales issues des plans non focalisés, sans possibilité de les discriminer. Le but de la microscopie à illumination structurée est de discriminer les basses fréquences spatiales suivant leur origine spatiale dans l’échantillon en leur assignant une signature spectrale. L’idée est de structurer l’illumination avec un motif, c’est-à-dire lui donner une structure spatiale, qui ne sera nette qu’au niveau du plan de focalisation. Cet effet permet de donner une capacité de sectionnement optique à une microscopie qui à la base est plein champ, tout en conservant la rapidité qui lui est intrinsèquement liée. Sa réalisation la plus simple a été développée par le groupe de T. Wilson et réside dans la prise de trois images successives,  $I_1$ ,  $I_2$  et  $I_3$ , avec des motifs d’illumination à franges décalées d’un tiers de période (des franges) entre chaque image [99]. Des microscopes à illumination structurée ont été commercialisés par différentes compagnies comme Zeiss sous le nom “Apotome” et Visitron Systems GmbH sous l’appellation “Visigrid”. Chacune de ces trois images contient des informations du plan de mise au point mais aussi des autres plans de l’échantillon. Néanmoins, seule l’information provenant du plan est modulée. Si l’on moyenne les trois images, on retrouve l’image obtenue dans un microscope

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

plein champ conventionnel  $I_{\text{conventionnel}}$  :

$$I_{\text{conventionnel}} = \frac{1}{3} (I_1 + I_2 + I_3). \quad (2.4)$$

Les composantes hors mise au point des différentes images n'étant pas modulées, elles sont alors communes d'une image à l'autre malgré un motif d'illumination différent. Ainsi, en soustrayant deux à deux les images, il est possible de reconstruire une coupe optique  $I_{\text{section}}$  :

$$I_{\text{section}} = \frac{\sqrt{2}}{3} \sqrt{(I_1 - I_2)^2 + (I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_3)^2}. \quad (2.5)$$

Néanmoins, cette technique souffre d'artefacts de reconstruction. Par exemple, il peut arriver que, sur l'image reconstruite  $I_{\text{section}}$ , des franges persistent du fait d'un photoblanchiment "structuré" de l'échantillon dans le plan de mise au point ou d'une mauvaise complémentarité des trois motifs d'illumination [100]. L'image finale est reconstruite suite à la prise consécutive de trois images du même plan. Afin d'augmenter la dynamique d'acquisition des images et de se rapprocher des cadences nécessaires à l'imagerie fonctionnelle *in vivo*, une autre technique d'illumination structurée a été développée par l'équipe de J. Mertz [8, 101, 102, 103]. Cette technique appelée HiLo nécessite la prise de seulement deux images avec deux illuminations différentes : une illumination uniforme (comme celle utilisé dans les microscopes plein champ standard) et une illumination structurée. Contrairement à la microscopie à illumination structurée présentée précédemment, la technique HiLo utilise, pour la reconstruction de la section, l'optique de Fourier basée sur l'analyse du contenu fréquentiel des images et non la soustraction d'images complémentaires dans l'espace réel.

### 2.2.3 Microscopie HiLo et algorithme de reconstruction des images.

#### 2.2.3.1 Principe de réalisation du sectionnement optique plein champ HiLo

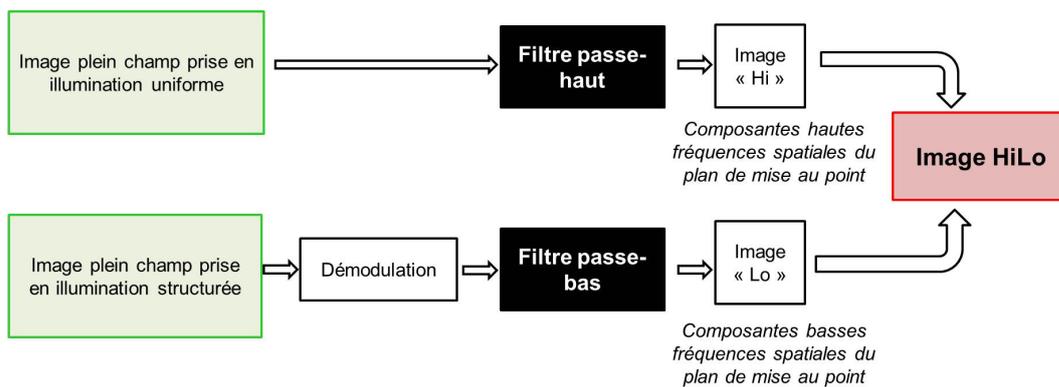


FIGURE 2.10 – Schéma du principe de la microscopie à illumination structurée de type HiLo.

La microscopie HiLo repose sur la prise de deux images du même plan avec deux illuminations différentes. Une des images est prise avec une illumination uniforme. Comme il a été expliqué dans la section 2.2.3.1, cette image contient à la fois des informations provenant du

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

---

plan imagé mais également des contributions provenant de plans hors mise au point, principalement des composantes basses fréquences spatiales. Ainsi pour rejeter ces composantes défocalisées, il suffit d'appliquer un filtre passe-haut à l'image prise en illumination uniforme, afin de ne conserver que les hautes fréquences spatiales qui proviennent exclusivement du plan de mise au point (image "Hi", figure 2.10). Toutefois, pour reconstruire totalement la coupe optique, l'information des composantes basses fréquences spatiales du plan de mise au point est manquante. Pour cela, une seconde image du même plan dans l'échantillon est prise cette fois avec une illumination structurée. Différents types de structuration peuvent être employés comme le speckle introduit par l'excitation cohérente du laser [8, 102] ou un motif de lignes [101] qui est celui qui sera utilisé dans notre étude. Cette structuration est choisie telle que son contraste diminue très rapidement avec la défocalisation. Ainsi, cette structuration de l'illumination va agir comme une porteuse optique, où seules les plans très proches du plan de mise au point présenteront une modulation significative. Une démodulation, associée à un filtrage passe-bas, permet alors d'avoir accès aux composantes basses fréquences spatiales du plan de mise au point (image "Lo", figure 2.10). La combinaison des deux images permet alors de reconstruire l'image HiLo qui est une coupe optique contenant à la fois les hautes et les basses fréquences spatiales du plan de mise au point dans la limite de la bande passante spectrale de notre système optique.

### 2.2.3.2 L'algorithme de reconstruction de la section optique

La façon dont un microscope image des structures périodiques est mathématiquement décrite par la fonction de transfert optique (FTO). La fonction de transfert optique est la transformée de Fourier de la fonction d'étalement du point (PSF) du microscope. Mathématiquement, en coordonnées cartésiennes  $(x, y, z)$  dans le domaine spatial, et  $(k_x, k_y, k_z)$  dans le domaine spectral, cette relation s'exprime sous la forme :

$$Image(x, y) = \int Objet(x, y, z) \otimes PSF(x, y; z) dz, \quad (2.6)$$

$$Image(k_x, k_y) = \int Objet(k_x, k_y, k_z) \times FTO(k_x, k_y; z) dz, \quad (2.7)$$

avec :

$$Image(k_x, k_y) = \mathcal{F}(Image(x, y)), \quad (2.8)$$

$$FTO(k_x, k_y; z) = \mathcal{F}(PSF(x, y; z)), \quad (2.9)$$

où  $\mathcal{F}$  correspond à la transformée de Fourier. Les propriétés de la fonction de transfert optique [104] du microscope optique assurent que les composantes hautes fréquences spatiales de l'image prise en illumination uniforme proviennent spécifiquement du plan de focalisation, car les hautes fréquences des plans hors focalisation ne passent pas dans le microscope. Ainsi, les hautes fréquences spatiales de la section  $I_{Hi}(\vec{\rho})$  sont extraites directement par application d'un filtrage passe-haut sur l'image prise en illumination uniforme (figure 2.11). L'extraction des composantes basses fréquences spatiales de la section est réalisée grâce à l'image prise en illumination structurée. Le motif d'illumination joue le rôle de porteuse qui sera modulée en

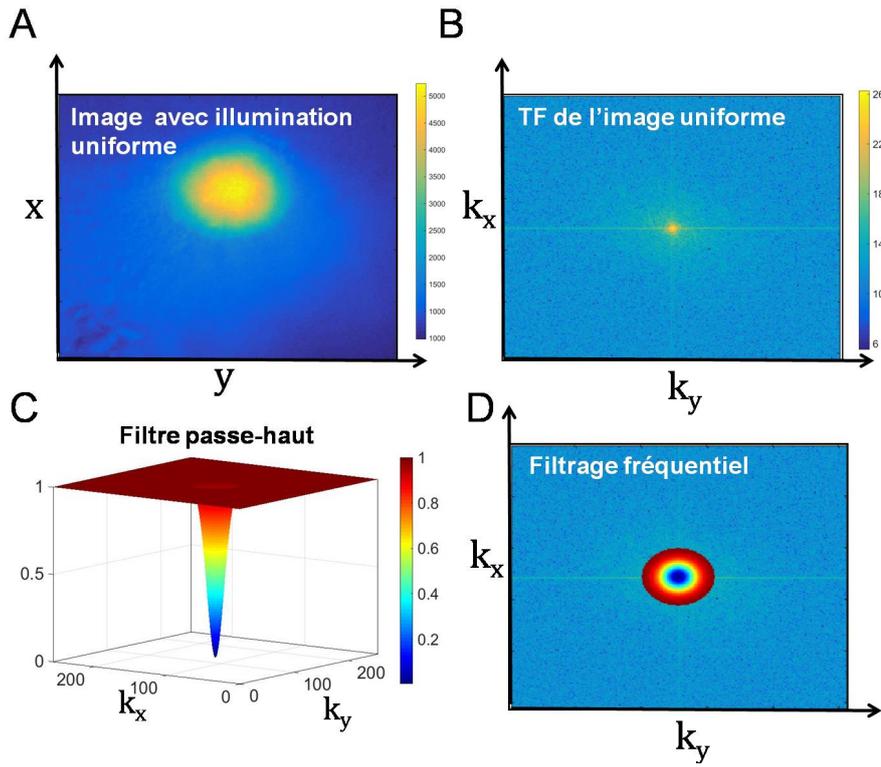


FIGURE 2.11 – Étapes de création de l'image “Hi”. (A) Acquisition de l’image avec une illumination uniforme. (B) Représentation dans l’espace de Fourier de l’image prise en illumination uniforme. (C) Filtre passe-haut de forme gaussienne centré sur la composante de fréquence nulle. (D) Application du filtre passe-haut dans le domaine fréquentiel à l’image prise en illumination uniforme. Pour plus de lisibilité de la figure (D), la couleur rouge foncé correspondant à la valeur égale à 1 du filtre passe-haut a été rendue transparente. TF : Transformée de Fourier.

intensité par les signaux de fréquences spatiales suffisamment basses provenant de l’échantillon. Le motif d’illumination n’étant bien contrasté qu’au niveau du plan de focalisation, seules les basses fréquences spatiales du plan de mise au point seront modulées et pourront alors être extraites en s’affranchissant des basses fréquences spatiales des autres plans de l’échantillon. Il est à noter que cette méthode ne pourrait pas être utilisée pour obtenir les hautes fréquences spatiales du plan de mise au point car il faudrait un motif d’illumination avec une période spatiale inférieure à la distance caractéristique de variation des détails. L’algorithme de reconstruction utilisé est explicité ci-dessous. Les intensités des images prises en illumination uniforme et structurée s’expriment sous la forme :

$$\begin{aligned}
 I_u(\vec{\rho}) &= I_{in}(\vec{\rho}) + I_{out}(\vec{\rho}), \\
 I_s(\vec{\rho}) &= \frac{I_{in}(\vec{\rho})}{2} (1 + M \sin(2\pi f\vec{u}\cdot\vec{\rho}) + h(\vec{\rho})) + \frac{I_{out}(\vec{\rho})}{2},
 \end{aligned}
 \tag{2.10}$$

où  $I_u(\vec{\rho})$ ,  $I_s(\vec{\rho})$ ,  $I_{in}(\vec{\rho})$  et  $I_{out}(\vec{\rho})$  correspondent respectivement à l’image prise en illumination uniforme, l’image prise en illumination structurée, les contributions du plan de mise au point et hors plan de mise au point. Le système d’expression correspond aux coordonnées spatiales

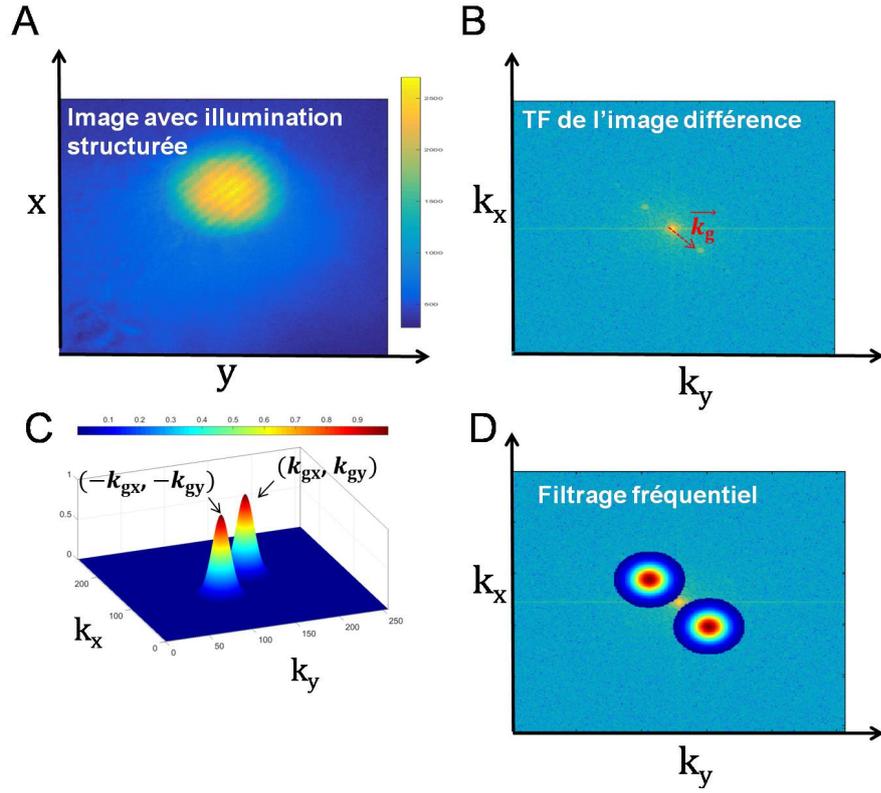


FIGURE 2.12 – Principales étapes de création de l'image “Lo”. (A) Acquisition de l’image avec une illumination structurée. (B) Représentation dans l’espace de Fourier de l’image différence  $I_{\text{diff}}(\vec{k})$ . Les pics dus à la modulation de la grille d’illumination sont selon  $\pm\vec{k}_g$ . (C) Filtre composé de deux gaussiennes centrées sur la fréquence spatiale de la grille  $(k_{gx}, k_{gy})$  et  $(-k_{gx}, -k_{gy})$ . (D) Application du filtre dans le domaine fréquentiel à l’image différence. Pour plus de lisibilité de la figure (D), la couleur bleu foncé correspondant à la valeur égale à 0 du filtre a été rendue transparente. TF : Transformée de Fourier.

latérales :  $\vec{\rho} = (\vec{x}, \vec{y})$ . Le terme  $M \sin(2\pi f \vec{u} \cdot \vec{\rho})$  est la première harmonique de la modulation du motif projeté, où  $\vec{u}$  est la direction du motif et  $f$  sa fréquence spatiale.  $h(\vec{\rho})$  représente les harmoniques d’ordres plus élevés car le motif projeté n’est généralement pas de forme sinusoïdale. L’évaluation du contraste du motif est réalisée en calculant la différence des deux images normalisées prises en illumination uniforme et structurée, notée  $I_{\text{diff}}(\vec{\rho})$  qui s’écrit sous la forme :

$$I_{\text{diff}}(\vec{\rho}) = \frac{I_u(\vec{\rho})}{\langle I_u(\vec{\rho}) \rangle} - \frac{I_s(\vec{\rho})}{\langle I_s(\vec{\rho}) \rangle}, \quad (2.11)$$

où  $\langle I \rangle$  est la valeur moyenne de l’image  $I$ . Le motif d’illumination étant une grille périodique binaire alors :  $\langle I_u(\vec{\rho}) \rangle = 2 \langle I_s(\vec{\rho}) \rangle$ . Ainsi  $I_{\text{diff}}(\vec{\rho})$  peut s’exprimer uniquement avec les contributions du plan de mise au point :

$$I_{\text{diff}}(\vec{\rho}) = \frac{I_u(\vec{\rho})}{\langle I_u(\vec{\rho}) \rangle} - \frac{I_s(\vec{\rho})}{\langle I_s(\vec{\rho}) \rangle} = -\frac{I_{\text{in}}(\vec{\rho})}{\langle I_u(\vec{\rho}) \rangle} (M \sin(2\pi f \vec{u} \cdot \vec{\rho}) + h(\vec{\rho})). \quad (2.12)$$

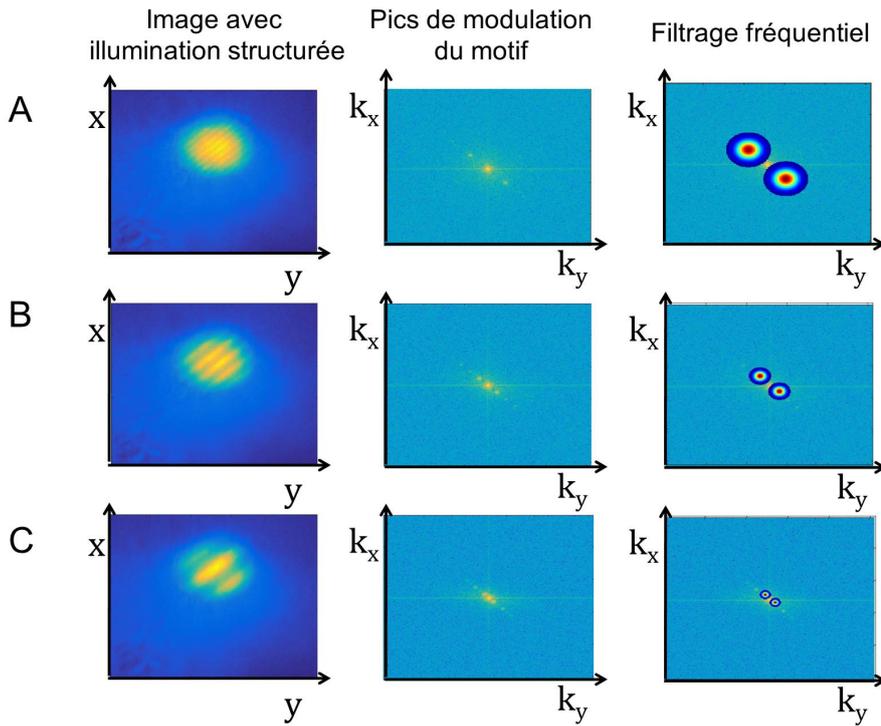


FIGURE 2.13 – Filtrage spatial fréquentiel pour différentes valeurs de fréquences spatiales du motif d'illumination. Pour chacun des cas sont montrés l'image avec l'illumination structurée et son équivalent dans l'espace de Fourier, ainsi que le filtrage fréquentiel à l'aide de deux gaussiennes centrées sur la position des fréquences spatiales du motif d'illumination. (A) Grille de période  $2 \mu\text{m}$ . (B) Grille de période  $4 \mu\text{m}$ . (C) Grille de période  $8 \mu\text{m}$ . La période spatiale de la grille est exprimée dans le plan de l'échantillon. Pour plus de lisibilité des figures de la troisième colonne, la couleur bleu foncé correspondant à la valeur égale à 0 du filtre a été rendue transparente.

La différence des images a permis de supprimer les composantes hors plan de mise au point car, comme dans le cas de la microscopie à illumination structurée où trois images sont prises avec des motifs de franges déphasées d'un tiers de période [99], la soustraction des images permet de s'affranchir des composantes non modulées car elles sont similaires dans les deux images. À l'intensité  $I_{\text{diff}}$  s'ajoute en pratique du bruit correspond au bruit de photons et aux variations éventuelles de l'échantillon, qui dans notre cas est vivant, entre la prise des deux images. Grâce à la modulation introduite par la structuration de l'illumination (terme en sinus dans l'équation 2.12), les composantes basses fréquences spatiales de la section  $I_{\text{in}}(\vec{\rho})$  sont dupliquées autour des pics de Dirac à la fréquence de modulation de la grille (figure 2.12B). Afin d'extraire l'information basses fréquences spatiales du plan de mise au point, on applique un filtre, noté  $F_{2g_1}$  composé de deux gaussiennes centrées sur les fréquences spatiales du motif d'illumination  $\pm k_g$  (figure 2.12C) :

$$F_{2g}(k_x, k_y) = \exp\left(-\frac{(k_x + k_{gx})^2 + (k_y + k_{gy})^2}{2w^2}\right) + \exp\left(-\frac{(k_x - k_{gx})^2 + (k_y - k_{gy})^2}{2w^2}\right). \quad (2.13)$$

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

Le paramètre  $w$  est proportionnel à la largeur à mi-hauteur du filtre gaussien qui s'écrit  $2\sqrt{2 \ln 2}w$ . Sa valeur est choisie empiriquement et est dépendante de la fréquence du motif d'illumination comme montré sur la figure 2.13. On peut remarquer que plus la période spatiale de la grille est importante (c'est-à-dire plus sa fréquence spatiale diminue), plus les pics de modulation se rapprochent de la fréquence nulle centrale. Ainsi, l'extraction des basses fréquences spatiales ne provenant effectivement que du plan de mise au point sera moins efficace.

L'image  $I_{\text{diff}}(\vec{\rho})$  est filtrée avec le filtre  $F_{2g}$  afin de ne garder que l'information présente autour des pics de fréquence spatiale  $\pm k_g$ . Cette information est ensuite ramenée autour de la fréquence nulle en prenant la valeur absolue de l'image filtrée. La dernière étape, pour obtenir l'image "Lo" notée  $I_{\text{Lo}}(\vec{\rho})$ , consiste alors à appliquer un filtre passe-bas complémentaire du filtre passe-haut utilisé pour obtenir l'image  $I_{\text{Hi}}(\vec{\rho})$ . La section optique  $I_{\text{HiLo}}(\vec{\rho})$  est finalement obtenue en combinant les images  $I_{\text{Hi}}(\vec{\rho})$  et  $I_{\text{Lo}}(\vec{\rho})$  qui contiennent respectivement les composantes hautes et basses fréquences spatiales du plan de mise au point [8] :

$$I_{\text{HiLo}}(\vec{\rho}) = I_{\text{Hi}}(\vec{\rho}) + \eta I_{\text{Lo}}(\vec{\rho}). \quad (2.14)$$

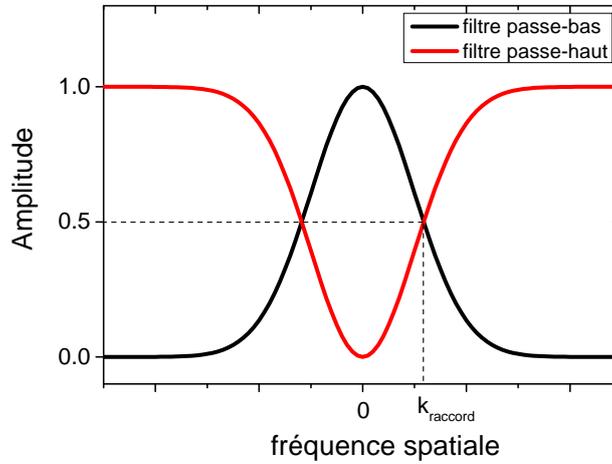


FIGURE 2.14 – Filtres gaussiens complémentaires passe-bas et passe-haut et définition de  $k_{\text{raccord}}$ .

Pour la recombinaison des deux images, un facteur de reconstruction, noté  $\eta$ , est utilisé afin d'ajuster le poids des composantes hautes et basses fréquences spatiales dans la section optique. Ce facteur est inversement proportionnel à la modulation effective  $M$  du motif dans l'échantillon [105]. Il peut être déterminé théoriquement en considérant que les spectres des images  $I_{\text{Hi}}(\vec{\rho})$  et  $I_{\text{Lo}}(\vec{\rho})$  doivent se recombinaison en  $\vec{k}_{\text{raccord}}$  où la valeur de  $\vec{k}_{\text{raccord}}$  est définie à partir des filtres complémentaires passe-haut et passe-bas utilisés, comme montré sur la figure 2.14 :

$$\mathcal{F}(I_{\text{Hi}}(\vec{k}_{\text{raccord}})) = \eta \mathcal{F}(I_{\text{Lo}}(\vec{k}_{\text{raccord}})), \quad (2.15)$$

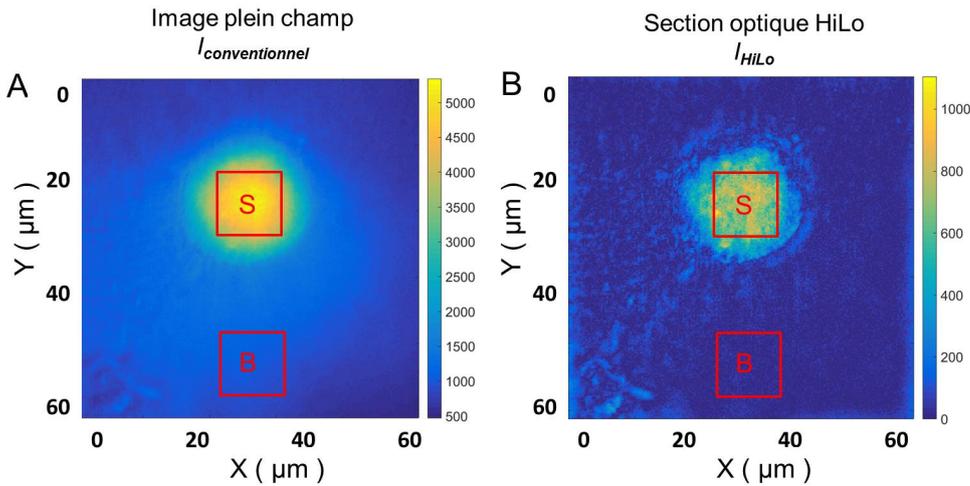


FIGURE 2.15 – Comparaison du rapport signal sur bruit entre microscopies plein champ conventionnelle et HiLo. (A) Image plein champ conventionnelle. Rapport signal sur bruit : 4. (B) Image HiLo. Rapport signal sur bruit : 26 ( $\eta = 2$ , période spatiale du motif d'illumination utilisé :  $4 \mu\text{m}$  dans le plan de l'échantillon). Les carrés rouges indiquent les zones utilisées pour le calcul du rapport signal sur bruit défini ici comme  $(\langle I \rangle_{\text{zone S}} - \langle I \rangle_{\text{zone B}}) / \langle I \rangle_{\text{zone B}}$  où  $\langle I \rangle_{\text{zone}}$  correspond à l'intensité moyenne de l'image dans la zone considérée.

où  $\mathcal{F}(I)$  est la transformée de Fourier de l'image  $I$ . La figure 2.15 illustre la capacité de sectionnement optique de la microscopie HiLo en comparaison de la microscopie plein champ conventionnelle où le rapport signal sur bruit, calculé dans les zones délimitées sur la figure 2.15, est multiplié par 6.5.

## 2.2.4 Le dispositif expérimental pour la microscopie HiLo

### 2.2.4.1 Le montage optique

Le dispositif est proche d'un microscope conventionnel d'épifluorescence adapté à l'imagerie de fluorophores dont les spectres d'excitation et d'émission se rapprochent de ceux de la protéine GFP.

Une schématisation en est donnée à la figure 2.16. La principale différence avec un microscope plein champ conventionnel est l'introduction d'une matrice de micro-miroirs (DLP Texas Instruments Discovery 4100 0.7 XGA 1024×768 micro-miroirs) pour structurer l'illumination. Une diode laser (Cube laser 488 nm 50 mW, Coherent) fournit le faisceau d'excitation. Un diffuseur de speckle permet de réduire la cohérence spatiale du laser qui, par effet d'interférences, peut dégrader la qualité des images reconstruites. Le faisceau est alors envoyé sur la matrice de micro-miroirs. Le détail de la structuration de l'illumination par la matrice de micro-miroirs est donné dans la section 2.2.4.2. Le faisceau est ensuite collimaté et réfléchi par un miroir dichroïque (F58-019UV, AHF) puis focalisé par l'objectif de microscope (Leica HC Fluotar L 25×/0.95 ON W VISIR, immersion à eau, distance de travail 2.5 mm ou Leica HCX APO L 40×/0.80 ON W, immersion à eau, distance de travail 3.3 mm) au niveau de l'échantillon. La fluorescence émise est récoltée par l'objectif de microscope. Le faisceau collimaté de sortie est

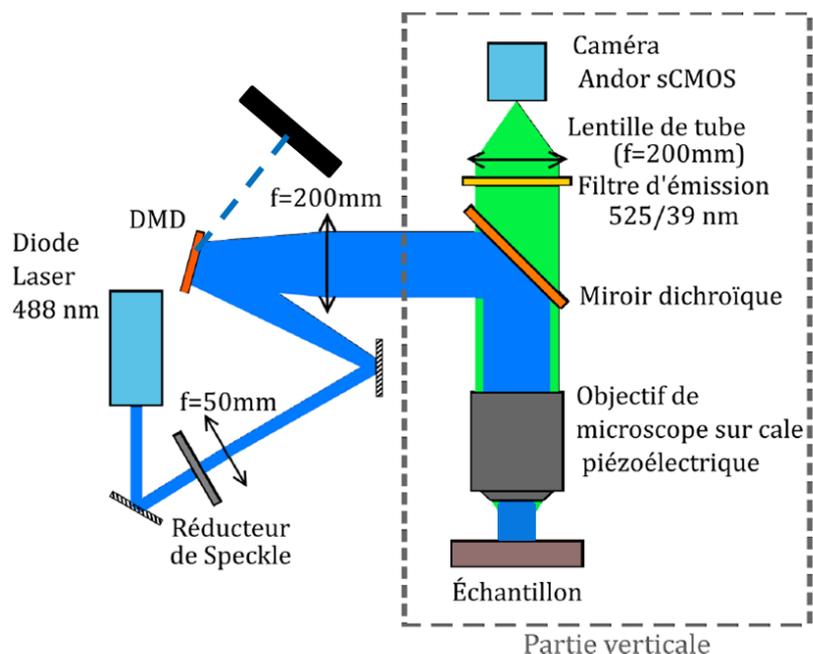


FIGURE 2.16 – Dispositif optique pour la microscopie à illumination structurée HiLo. Le faisceau laser est façonné par la matrice de micro-miroirs (DMD). Les faisceaux d'excitation et d'émission sont séparés par un miroir dichroïque. L'émission de fluorescence est enregistrée sur un capteur sCMOS ("scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor"). Le cadre en pointillés correspond à la partie verticale du dispositif. Le schéma n'est pas à l'échelle.

transmis par le miroir dichroïque, filtré par un filtre centré à 525 nm et de largeur spectrale 39 nm (MF525-39, Thorlabs), puis imagé sur un capteur sCMOS (Andor Neo 5.5 sCMOS) grâce à la lentille de tube de distance focale 200 mm. Les caractéristiques spectrales du filtre d'émission ainsi que du miroir dichroïque, qui permet de séparer les faisceaux d'excitation et d'émission, sont données à la figure 2.17. Le miroir dichroïque est constitué d'un dépôt de multicouches diélectriques sur un substrat épais (épaisseur 5 mm) permettant de limiter des effets d'astigmatisme qui pourraient être induits par des déformations mécaniques affectant ce miroir. Le point essentiel en microscopie à illumination structurée est la conjugaison optique du plan de la matrice de micro-miroirs et du plan de mise au point de l'objectif. Pour vérifier cette conjugaison, on image une mire avec une illumination structurée. La structuration de l'illumination laser est visualisée grâce à la diffusion sur cette mire. La structuration naturelle de la mire doit être nette de façon simultanée avec la structuration de l'illumination introduite par la matrice de micro-miroirs (figure 2.18). Afin de permettre l'imagerie rapide en 3D, l'objectif de microscope est monté sur un module piezo-électrique (Pifoc, Princeton Instrument) de course 100  $\mu\text{m}$  et d'une précision de positionnement de 20 nm.

### 2.2.4.2 La matrice de micro-miroirs

Dans l'implémentation originelle de la microscopie HiLo par le groupe de J. Mertz, la structuration de l'illumination était assurée par une grille physique [101], limitant la vitesse

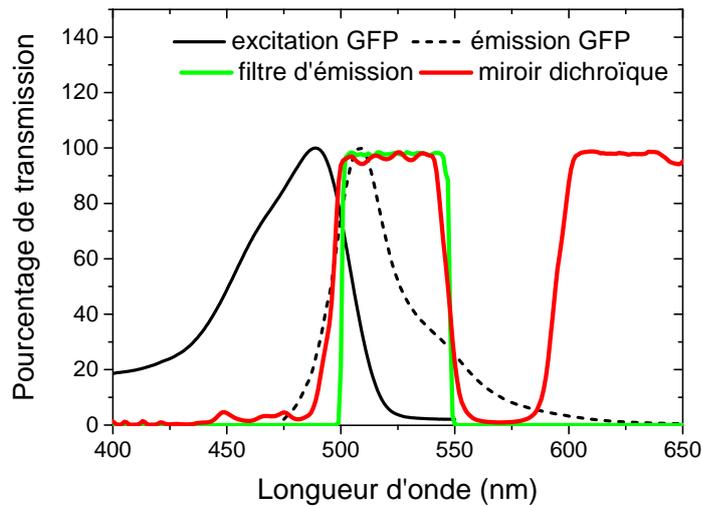


FIGURE 2.17 – Caractéristiques spectrales du filtre d'émission ainsi que du miroir dichroïque utilisés pour l'imagerie de fluorophores de type GFP. Les spectres d'excitation et d'émission de la molécule de GFP sont également représentés. Remarque : la deuxième bande de transmission du miroir dichroïque n'est pas utilisée sur le dispositif en l'état actuel mais a été pensée pour l'implémentation future d'une seconde voie spectrale d'imagerie utilisant comme fluorophore une protéine, de type mCherry, émettant dans le rouge.

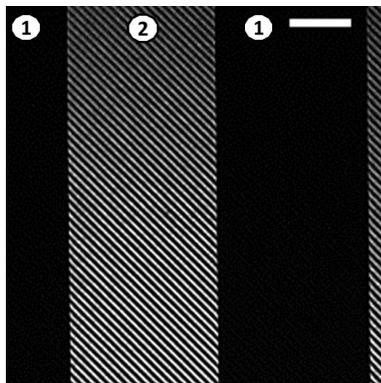


FIGURE 2.18 – Illustration de la conjugaison optique du plan de la matrice de micro-miroirs assurant la structuration de l'illumination, et du plan focal de l'objectif. Une mire objet, présentant un motif périodique composé de 20 traits par millimètre (1), a été imagée avec une illumination structurée par des franges de période environ égale à  $2 \mu\text{m}$  (2). Barre d'échelle :  $10 \mu\text{m}$ .

d'acquisition à la cadence vidéo (24 images par seconde). Afin d'augmenter la dynamique temporelle accessible, nécessaire à l'imagerie fonctionnelle du réseau neuronal de la drosophile *in vivo*, nous avons tiré parti du développement technologique des microsystèmes électromécaniques. Ainsi, la structuration de l'illumination sur notre dispositif de microscopie HiLo est assurée par une matrice de micro-miroirs orientables (DMD pour "Digital Micromirror

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

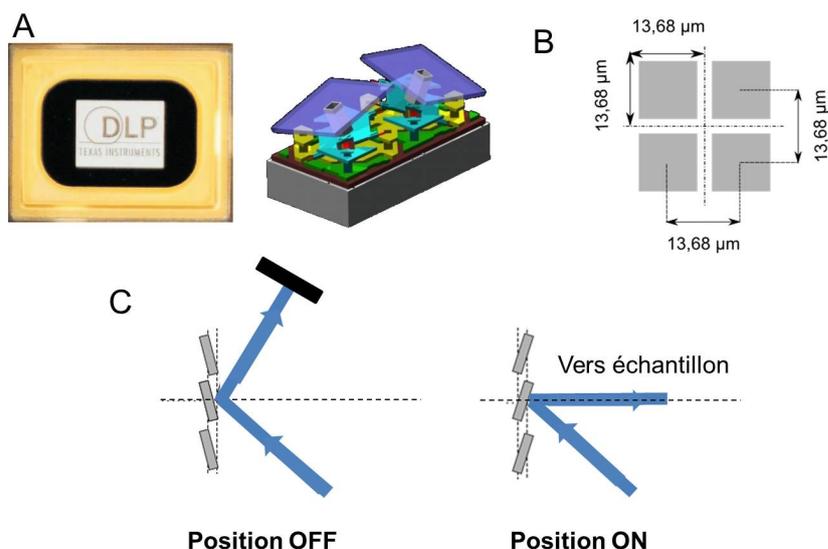


FIGURE 2.19 – Principe de fonctionnement de la matrice de micro-miroirs. (A) Photographie de la matrice de micro-miroirs développée par Texas Instruments et schématisation de deux des micro-miroirs composant la matrice. La matrice, de dimension totale  $14 \times 10.5$  mm, est composée de 1024 par 768 micro-miroirs orientables individuellement suivant deux positions. (B) Caractéristiques spatiales des micro-miroirs. La distance entre les centres de deux miroirs consécutifs est de  $13.68 \mu\text{m}$ . (C) Orientation binaire des micro-miroirs. Position “ON” : la lumière est réfléchié vers l’échantillon. Position “OFF” : la lumière est réfléchié en dehors du montage optique.

Device”) développée par Texas Instrument (figure 2.19A). Cette technologie est communément employée dans les systèmes de projection comme les vidéoprojecteurs. La matrice est composée de 1024 par 768 micro-miroirs présentant un revêtement en aluminium, de côté mesurant  $13.6 \mu\text{m}$  (figure 2.19B), contrôlables individuellement, permettant de façonner un faisceau d’environ 10 mm de diamètre. Ces micro-miroirs peuvent prendre uniquement deux orientations différentes,  $\pm 12^\circ$ , qui permettent de moduler en intensité le faisceau laser d’excitation. En effet, si le micro-miroir est en position “ON”, le faisceau laser est réfléchi vers l’échantillon alors qu’il est dirigé dans une autre direction lorsqu’il est en position “OFF” (figure 2.19C). En assignant individuellement un caractère “OFF” ou “ON” à chacun des 786432 micro-miroirs de la matrice, grâce à des forces électrostatiques, il est alors possible de créer des motifs d’illumination bidimensionnels binaires.

Afin de réaliser la microscopie HiLo, deux images sont nécessaires pour reconstruire la coupe optique. Ainsi, si l’on veut suivre à haute cadence l’évolution du signal de fluorescence provenant d’un plan de l’échantillon, il est indispensable d’alterner rapidement les motifs d’illumination uniforme et structurée. La matrice de micro-miroirs rend l’imagerie HiLo à haute cadence possible. En effet, seules  $5.5 \mu\text{s}$  sont requises pour passer d’un motif à l’autre (figure 2.20), ce qui correspond à une fréquence maximale de défilement du motif d’environ 180 kHz. Une telle dynamique est possible grâce à un stockage des motifs dans la mémoire du système de micro-miroirs préalablement à l’imagerie. La rapidité d’acquisition des images sera

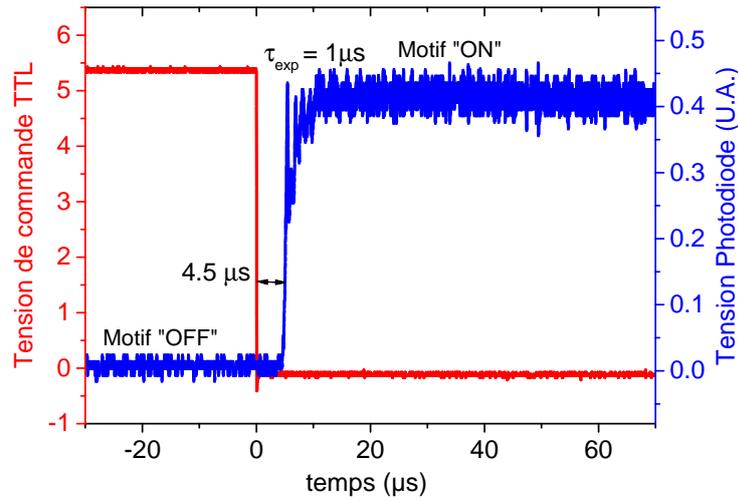


FIGURE 2.20 – Caractérisation du temps de changement du motif par la matrice de micro-miroirs. Le déclenchement se fait sur le front descendant d'un signal logique TTL (Transistor Transistor Logic). Les motifs alternés, pour la mesure du temps de réponse, sont : un motif "OFF" (tous les micro-miroirs en "OFF") et un motif "ON" (tous les micro-miroirs en "ON"). Le temps de basculement de l'ensemble des micro-miroirs a été estimé à  $1 \mu\text{s}$  par modélisation exponentielle. Pour la mesure, une photodiode (Thorlabs PDA36A) a été placée en aval de la matrice de micro-miroirs. Son temps de réponse typique est de 100 ns pour un gain de 0 dB.

alors plus limitée par le rapport signal sur bruit dû à la quantité de fluorescence émise par l'échantillon biologique que par la dynamique de la matrice de micro-miroirs.

Un autre avantage de la matrice de micro-miroirs est sa grande flexibilité : il est possible de générer une grande quantité de motifs différents. On peut par exemple varier l'orientation du motif de structuration (figure 2.21) ou varier sa fréquence spatiale (figure 2.22). Cette variation de fréquence spatiale peut être mise à profit pour l'imagerie en profondeur de l'échantillon. En effet, lorsque l'on veut imager en profondeur des tissus biologiques, notamment le cerveau de la drosophile, les aberrations optiques et la diffusion affectent la transmission des composantes hautes fréquences spatiales. Ainsi, une solution est d'adapter en temps réel la fréquence spatiale de la grille avec la profondeur. Une réduction de la fréquence spatiale de la grille conduit toutefois à la reconstruction d'une coupe optique de moins bonne qualité car plus épaisse. En microscopie confocale cela revient à élargir le trou de filtrage afin de récolter plus de photons notamment en profondeur. L'avantage de l'illumination structurée par micro-miroirs est que la fréquence spatiale de la grille peut être variable au cours d'une acquisition 3D alors que la taille du trou de filtrage en microscopie confocale est généralement fixe au cours d'un enregistrement. La matrice de micro-miroirs permet aussi de créer des motifs plus complexes permettant par exemple de réduire la zone de l'échantillon exposée à l'excitation lumineuse (figure 5.2) afin de réduire les potentiels effets de phototoxicité et/ou de photoblanchiment qui

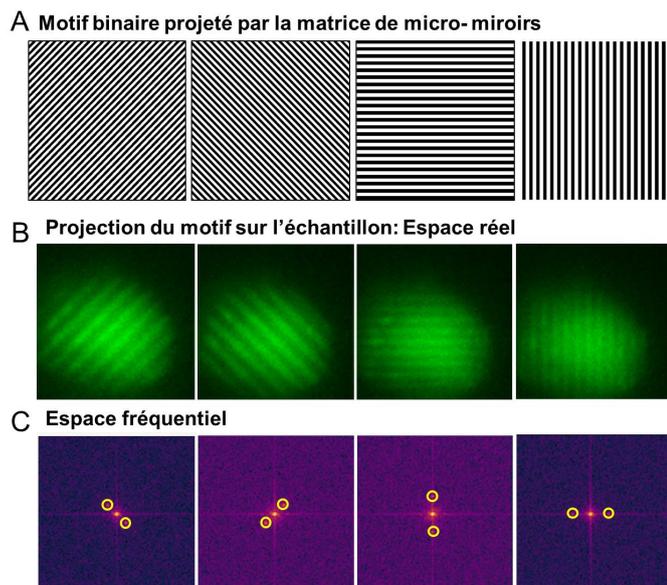


FIGURE 2.21 – Différentes orientations du motif de structuration de l'illumination. (A) Motifs binaires de commande de la matrice de micro-miroirs. (B) Image de l'échantillon avec une illumination structurée. La zone imagée est le lobe  $\alpha$  des corps pédonculés d'une drosophile exprimant la protéine GFP. (C) Diagrammes de Fourier montrant la position des pics en fonction de l'orientation du motif d'illumination.

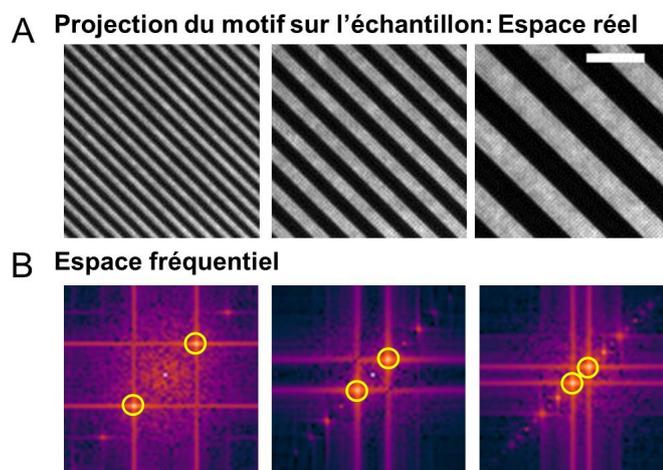


FIGURE 2.22 – Différentes périodes spatiales du motif de structuration de l'illumination. (A) Image de l'échantillon avec une illumination structurée pour trois périodes de motif de structuration : 2, 4 et 8  $\mu\text{m}$ , dans le plan de l'échantillon. L'échantillon utilisé est un miroir. Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . (C) Diagrammes de Fourier montrant la position des pics de modulation en fonction de la fréquence spatiale de la grille. Les ronds jaunes correspondent à la première harmonique du motif d'illumination (terme  $M \sin(2\pi f \vec{u} \cdot \vec{\rho})$  de l'équation 2.10).

peuvent impacter l'échantillon biologique vivant. La réduction de taille de la zone illuminée par le laser d'excitation permet également de réduire le nombre de photons de fluorescence

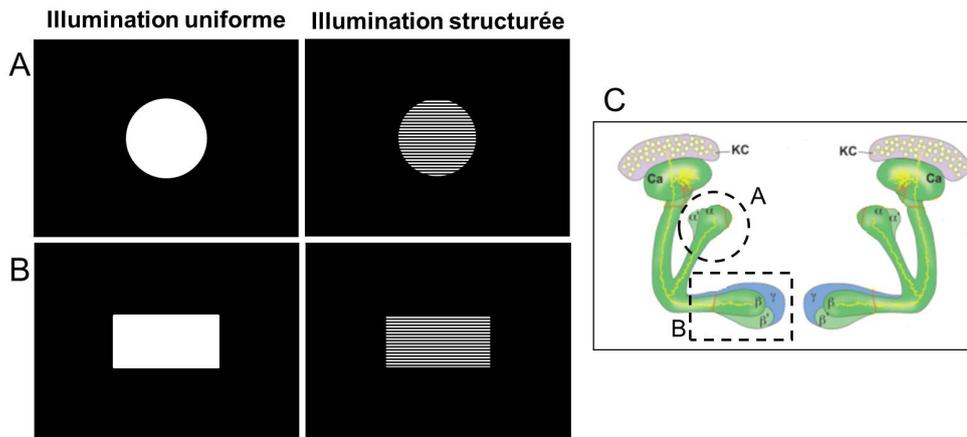


FIGURE 2.23 – Exemples de motifs permettant de réduire la zone de l'échantillon exposée au laser. (A) Forme circulaire. (B) Forme rectangulaire. (C) Correspondance des motifs présentés en (A) et (B) avec les régions biologiques d'intérêt. Les motifs (A) et (B) permettent respectivement d'imager, par exemple, les lobes  $\alpha$  et  $\beta$  des corps pédonculés de la drosophile. La figure (C) a été adaptée de [24].

générés dans les plans hors mise au point et ainsi de faciliter la coupe optique. La rapidité et la flexibilité de la matrice de micro-miroirs permettent également de rélisier un équivalent de microscopie multiconfocale par matrice programmable (PAM pour "Programmable Array Microscope") [106, 107]. Des études en optogénétique peuvent être également facilitées en couplant biosenseurs effecteurs, comme la channelrhodopsine ou la halorhodopsine présentés dans le Chapitre 1, et matrice de micro-miroirs, afin de contrôler précisément spatialement et temporellement la photostimulation [108, 109, 110, 111].

### 2.2.4.3 La synchronisation du dispositif et la réalisation de coupes optiques HiLo

L'ensemble du dispositif est synchronisé à l'aide d'un générateur de fonctions à deux voies (Keysight technologies, 33522B Waveform Generator). L'une des voies contrôle par un signal digital TTL (0-5V) le déclenchement simultané de l'exposition laser, de la projection du motif par la matrice de micro-miroirs et de la prise de l'image par la caméra. La seconde voie du générateur de fonction est utilisée pour l'imagerie tridimensionnelle. Elle permet de synchroniser le balayage axial de l'objectif avec l'imagerie. Le temps de stabilisation du nano-positionneur piezo-électrique sur lequel est monté l'objectif de microscope étant de 30 ms, celui-ci a été utilisé en balayage continu et non par "saut". Un exemple de signaux digital et analogique, pour le contrôle respectivement du dispositif d'imagerie (laser, matrice de micro-miroirs et caméra) et du balayage en profondeur de l'objectif, est donné sur la figure 2.24. Pour l'imagerie HiLo, il est important que la différence de profondeur d'imagerie entre l'image prise en illumination uniforme et l'image prise en illumination structurée soit tout au plus égale à la profondeur de champ du microscope. La figure 2.25 résume les différentes composantes nécessaires à la réalisation de coupes optiques dans un échantillon tridimensionnel.

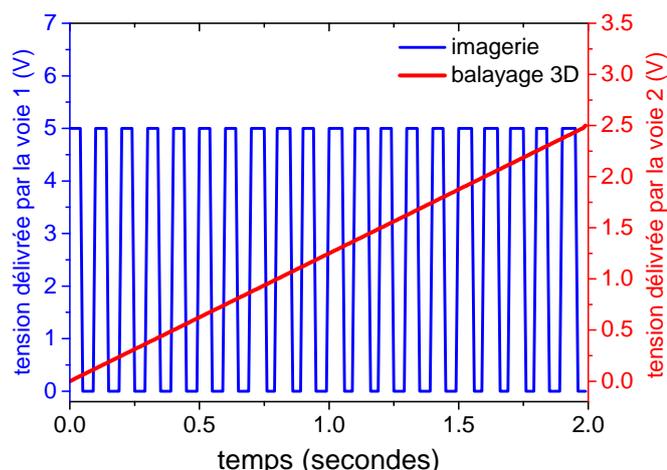


FIGURE 2.24 – Exemple de signaux de synchronisation pour l'imagerie tridimensionnelle. Un signal carré (0-5V), ici de fréquence 10 Hz, permet de déclencher l'illumination laser, la projection du motif par la matrice de micro-miroirs et la prise d'images par la caméra. Le signal en forme de rampe contrôle le balayage linéaire continu de la position de l'objectif dans la direction axiale sur une profondeur de  $50\ \mu\text{m}$ . Dans cet exemple, l'objectif bouge de  $2.5\ \mu\text{m}$  pendant un temps de pause.

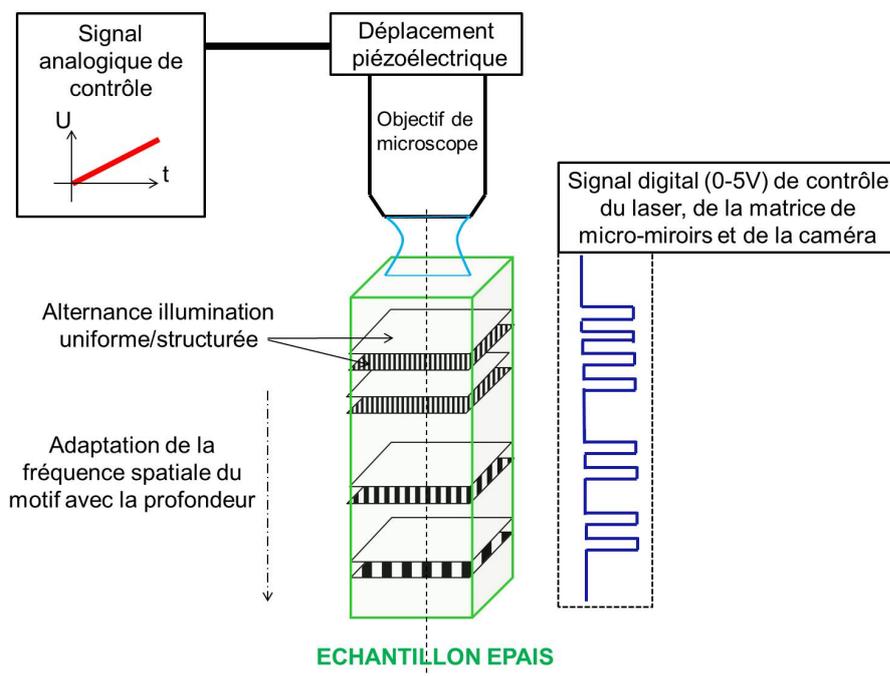


FIGURE 2.25 – Schéma récapitulatif du procédé d'imagerie tridimensionnelle d'un échantillon.

### 2.2.5 Caractérisation du microscope à illumination structurée

Nous avons testé les performances de notre dispositif optique en termes de résolution spatiale (PSF), de transmission fréquentielle (FTO) et de capacité de sectionnement optique.

2.2.5.1 Évaluation de la réponse impulsionnelle

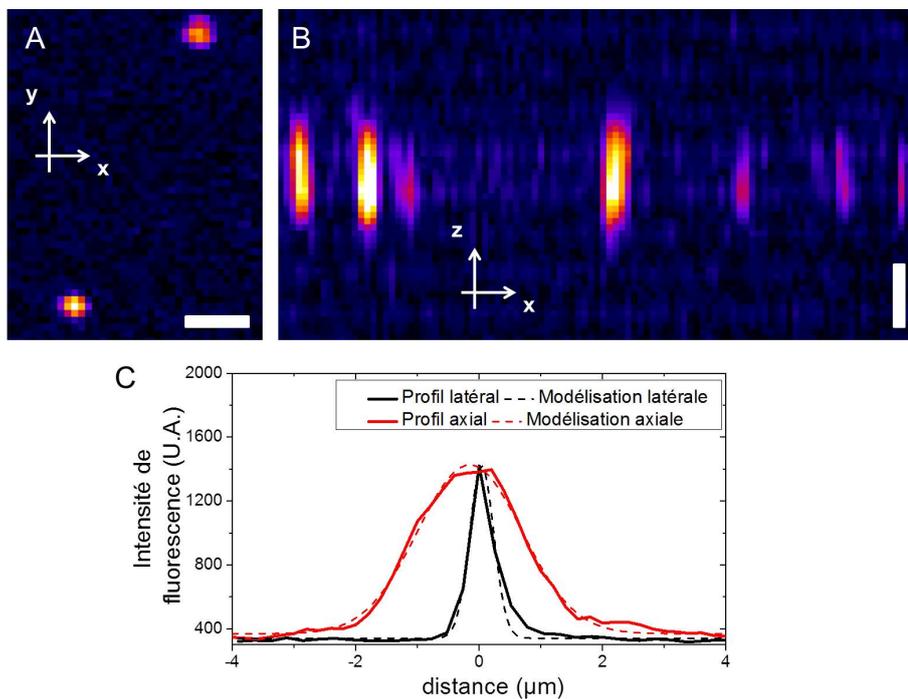


FIGURE 2.26 – Imagerie de billes fluorescentes vertes de 100 nm de diamètre dans un gel d'agarose de concentration massique 2%. (A) Coupe latérale ( $x, y$ ). Barre d'échelle :  $2 \mu\text{m}$ . (B) Reconstruction axiale ( $x, z$ ). Barre d'échelle :  $2 \mu\text{m}$ . (C) Profils d'intensité latéraux et axiaux moyennés de billes fluorescentes de diamètre 100 nm.  $n = 5$  billes. Objectif Leica  $40\times 0.8 \text{ ON}$ .

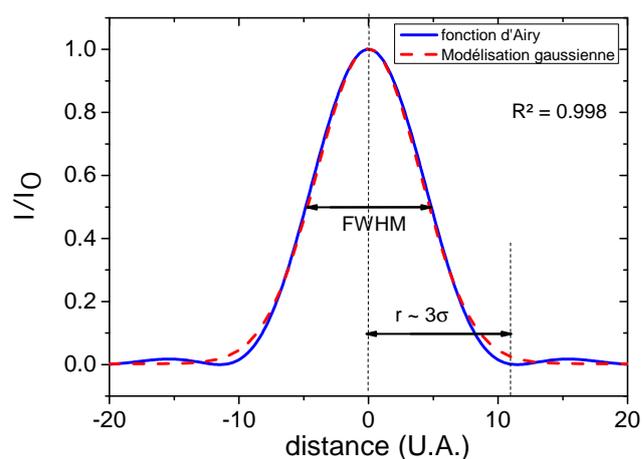


FIGURE 2.27 – Modélisation d'une fonction d'Airy par une fonction gaussienne. Le coefficient de détermination  $R^2$  vaut 0.998. FWHM et  $\sigma$  correspondent respectivement à la largeur à mi-hauteur et à l'écart-type de la modélisation gaussienne.  $r$  est le rayon de la tache d'Airy.

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

Afin de déterminer les résolutions latérale et axiale du microscope, il est nécessaire d'évaluer la fonction d'étalement d'un objet ponctuel par le système optique (PSF). Pour cela, l'objet imagé doit avoir une dimension inférieure ou égale à la limite de diffraction du microscope. L'image d'un tel objet correspond à un motif de diffraction appelé tache d'Airy. Pour un microscope de plein champ conventionnel limité par diffraction et utilisant un objectif d'ouverture numérique  $ON$  en immersion dans un liquide d'indice de réfraction  $n$ , les résolutions latérales  $\Delta_{x,y}$  et la résolution axiale  $\Delta_z$  sont obtenues à partir des formules [112] :

$$\Delta_{x,y} = \frac{0.61 \times \lambda}{ON}, \quad (2.16)$$

$$\Delta_z = \frac{2 \times \lambda \times n}{ON^2}. \quad (2.17)$$

$\lambda$  est la longueur d'onde d'émission de l'objet étudié.  $\Delta_{x,y}$  est le rayon du premier anneau sombre autour de la tache centrale de diffraction.  $\Delta_z$  est la résolution axiale, c'est-à-dire mesurée le long de l'axe optique du microscope, et correspond au premier minimum axial de la figure de diffraction 3D. Pour déterminer la valeur expérimentale de la résolution spatiale du microscope, j'ai confectionné des échantillons de billes fluorescentes de 100 nm de diamètre (Fluosphere, F8803) de longueur d'onde d'excitation 505 nm et d'émission 515 nm contenues dans un gel d'agarose polymérisé de concentration massique 2%. Pour de tels objets "ponctuels", il n'y a pas de différence entre les images HiLo et plein champ conventionnel car dans notre cas, il n'est pas possible de projeter un motif de période spatiale inférieure à la taille caractéristique des billes. Ainsi, la détermination des résolutions spatiales latérale et axiale a été réalisée uniquement sur des images prises en illumination uniforme. La figure 2.26 montre les coupes latérale et axiale de l'image de billes de 100 nm. On constate tout d'abord une grande anisotropie de résolution qui est vraie dans tous les microscopes limités par diffraction, à savoir que la résolution latérale est bien meilleure que la résolution dans l'axe de propagation de la lumière. Afin de quantifier ces résolutions, des profils d'intensité de fluorescence latéraux et axiaux moyennés sur 5 billes fluorescentes ont été tracés. (figure 2.26C).

	Latéral	Axial
$FWHM_i$	$440 \pm 40$ nm	$2.0 \pm 0.1$ $\mu$ m
$FWHM_i$ déconvoluée	$340 \pm 40$ nm	$1.9 \pm 0.1$ $\mu$ m
$\Delta_i$ expérimentale	$435 \pm 50$ nm	$2.4 \pm 0.1$ $\mu$ m
$\Delta_i$ théorique	390 nm	2.2 $\mu$ m

Tableau 2.1 – Tableau récapitulatif des largeurs à mi-hauteur latérales et axiales  $FWHM_i$  des modélisations gaussiennes de la fonction d'Airy et comparatif des résolutions latérales  $\Delta_i$  et axiales expérimentales et théoriques.  $i$  correspond soit à  $x, y$ , soit à  $z$  respectivement pour les déterminations latérales ou axiales. Objectif Leica  $40\times 0.8$  ON.

La modélisation exacte des figures de diffraction fait intervenir la fonction de Bessel du premier ordre (fonction d'Airy). Néanmoins, une approximation gaussienne de la PSF est très

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

---

souvent utilisée dans les algorithmes de traitement d'images afin de réduire leur complexité [113]. Une approximation simple de la réponse impulsionnelle de tous les systèmes optiques est alors obtenue en négligeant les petits anneaux de la tache d'Airy et en supposant que le lobe principal de la PSF puisse être approché par une fonction gaussienne (figure 2.27). J'ai utilisé une modélisation du type :

$$\frac{I_0}{FWHM \times \sqrt{\frac{\pi}{4 \times \ln 2}}} \times \exp\left(\frac{-4 \times \ln 2 \times x^2}{FWHM^2}\right), \quad (2.18)$$

où  $FWHM$  est la largeur à mi-hauteur (FWHM pour "Full Width Half Maximum"). Les résultats sont résumés dans le tableau 2.1. On obtient des largeurs à mi-hauteur de  $440 \pm 40$  nm et  $2.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$  respectivement pour les directions latérale et axiale. Les valeurs théoriques des résolutions spatiales, dans le cas d'un système limité par diffraction, sont données par les formules 2.16 et 2.17. Pour une ouverture numérique égale à 0.8, un indice de réfraction du milieu d'immersion égal à 1.33, et une longueur d'onde d'émission  $\lambda$  valant 515 nm, on obtient, par la théorie de la diffraction, une résolution latérale  $\Delta_{x,y}$  de 390 nm et une résolution axiale  $\Delta_z$  de  $2.2 \mu\text{m}$ . Afin de pouvoir comparer les largeurs à mi-hauteur des modélisations gaussiennes de la tache d'Airy déterminées expérimentalement, aux valeurs théoriques de résolution, une approximation courante consiste à considérer que l'écart-type de la gaussienne de modélisation est le tiers de la résolution spatiale. Pour une gaussienne de largeur à mi-hauteur  $FWHM$  et d'écart-type  $\sigma$ , on a la relation :  $FWHM = 2 \sqrt{2 \ln 2} \times \sigma$  car la modélisation gaussienne peut aussi s'exprimer en fonction de l'écart-type  $\sigma$  sous la forme :

$$\frac{I_0}{\sigma \sqrt{2\pi}} \times \exp\left(\frac{-x^2}{2\sigma^2}\right). \quad (2.19)$$

Ainsi, la valeur expérimentale de  $\Delta_{x,y}$  est donnée par la formule :

$$\begin{aligned} \Delta_{x,y} &= 3 \times \sigma_{x,y} \\ &= 3 \times \frac{FWHM_{x,y}}{2 \sqrt{2 \ln 2}} \\ &\simeq \frac{FWHM_{x,y}}{0.78}. \end{aligned} \quad (2.20)$$

Préalablement à cette étape, il convient aussi de tenir compte, par déconvolution, de la taille de la bille. Finalement, on trouve expérimentalement des résolutions latérale et axiale de  $435 \pm 50$  nm et  $2.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ . Les mesures expérimentales des résolutions latérale et axiale n'égalent pas les valeurs théoriques qui sont de 390 nm et  $2.2 \mu\text{m}$ . On peut toutefois noter que les valeurs théoriques ne s'appliquent que si l'on considère un système optique sans aberration. Une dégradation de la résolution expérimentale par rapport aux valeurs théoriques peut être due par exemple à un remplissage partiel de la pupille de l'objectif. En considérant la formule 2.17 et la valeur expérimentale  $\Delta_z$  mesurée pour l'objectif  $40\times$  d'ouverture numérique théorique 0.8, il est possible de calculer l'ouverture numérique  $ON$  effectivement utilisée pour l'imagerie ( $ON_{\text{eff}}$ ). Le calcul donne une valeur de 0.7 pour l'ouverture numérique effective de l'objectif utilisé sur ce système optique. Ces mêmes mesures ont été faites en utilisant l'objectif Leica

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

Fluotar 25× 0.95 ON et ont conduit à une valeur de l'ouverture numérique effective de 0.6, ce qui est moins bon que l'autre objectif. Cette constatation peut vraisemblablement s'expliquer par le fait que les objectifs de grande ouverture numérique sont plus sensibles aux aberrations optiques qui peuvent affecter le dispositif [114].

### 2.2.5.2 Réponse fréquentielle du microscope

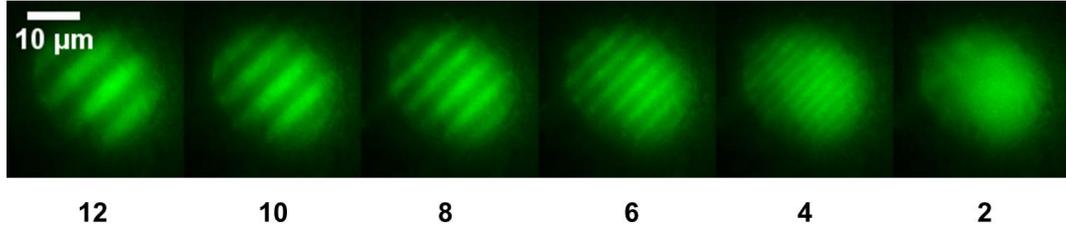


FIGURE 2.28 – Images de fluorescence du lobe  $\alpha$  d'une drosophile exprimant la protéine de GFP au niveau des corps pédonculés pour différentes fréquences spatiales du motif d'illumination. La période spatiale des motifs utilisés varie de 2 à 12 pixels au niveau de la matrice de micro-miroirs (DMD) ce qui correspond à des périodes dans le plan de l'échantillon variant typiquement de 1 à 6  $\mu\text{m}$ . Objectif Leica Fluotar 25× 0.95 ON.

Afin de compléter la caractérisation du microscope, nous avons déterminé sa réponse fréquentielle en termes de fréquences spatiales. La réponse fréquentielle du microscope a été testée grâce au façonnage de motifs d'illumination de différentes fréquences spatiales par la matrice de micro-miroirs. Des motifs de 2 à 12 pixels de période sur la matrice de micro-miroirs ont été utilisés (figure 2.28). Contrairement à la détermination de la réponse impulsionnelle, la qualité de la réponse fréquentielle dépend non seulement de la voie d'émission mais également de la voie d'excitation. Pour déterminer le contraste  $C$  des lignes, nous avons calculé l'écart-type de l'image différence  $I_{\text{diff}}$ , définie à l'équation 2.12, où seule la première harmonique correspondant à la fréquence spatiale du motif d'illumination,  $(M \sin(2\pi f \vec{u} \cdot \vec{\rho}))$  est conservée :

$$C(f) = \sigma \left[ \frac{I_{\text{in}}(\vec{\rho})}{\langle I_{\text{u}}(\vec{\rho}) \rangle} (M \sin(2\pi f \vec{u} \cdot \vec{\rho})) \right]. \quad (2.21)$$

Pour une image  $I$  de taille  $A \times B$  pixels, l'écart-type  $\sigma(I)$  est défini ainsi :

$$\sigma(I) = \sqrt{\frac{1}{A \times B} \sum_{x=1}^A \sum_{y=1}^B (I(x, y) - \langle I \rangle)^2}, \quad (2.22)$$

avec  $\langle I \rangle = \frac{1}{A \times B} \sum_{x=1}^A \sum_{y=1}^B I(x, y)$ .

Les résultats des mesures de contraste sur un échantillon mince et en surface dans le cerveau de la drosophile sont donnés dans la figure 2.29. On remarque que le contraste des franges de modulation diminue avec la fréquence spatiale du motif. En effet, tout microscope optique se comporte comme un filtre passe-bas, du fait de l'ouverture limitée des objectifs de

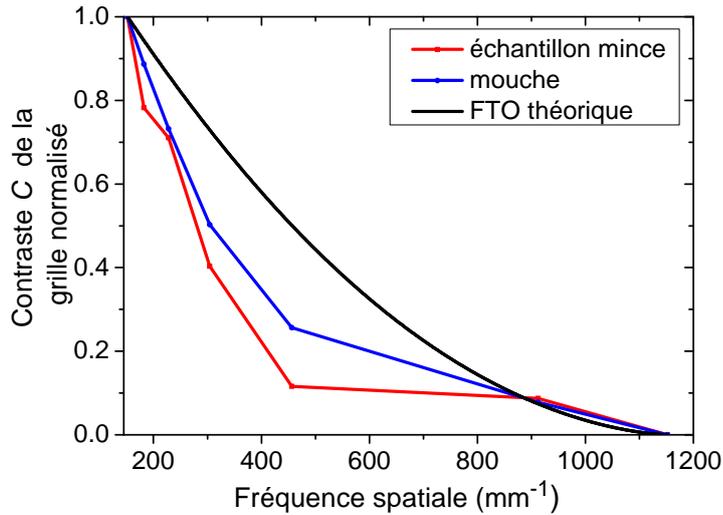


FIGURE 2.29 – Contraste du motif d’illumination en fonction de sa fréquence spatiale. Pour le contraste mesuré en surface dans le cerveau, les données de 5 drosophiles ont été moyennées. Les fréquences spatiales sont exprimées dans le plan de l’échantillon.

microscope par exemple, et au delà d’une certaine fréquence appelée fréquence de coupure, la transmission s’annule. La fréquence de coupure de notre système semble être à environ  $1160 \pm 100$  lignes. $\text{mm}^{-1}$ . La fonction de transfert optique contient les informations des voies d’excitation laser et d’émission de fluorescence (rayonnement incohérent). La fonction de transfert optique [104] d’un tel système, limité par diffraction, avec des pupilles d’entrée et de sortie circulaires est donnée par l’équation 2.23 et est représentée sur la figure 2.29.

$$FTO(f) = \left\{ \frac{2}{\pi} \left[ \arccos \left( \frac{f}{f_0} \right) - \frac{f}{f_0} \sqrt{1 - \left( \frac{f}{f_0} \right)^2} \right] \right\} \times \left\{ \frac{2}{\pi} \left[ \arccos \left( \frac{f}{2f_0} \right) - \frac{f}{2f_0} \sqrt{1 - \left( \frac{f}{2f_0} \right)^2} \right] \right\}, \quad (2.23)$$

où  $f_0$  est la fréquence de coupure pour un système cohérent et s’exprime sous la forme :

$$f_0 = \frac{ON_{\text{eff}}}{\lambda} = 1160 \text{ lignes}.\text{mm}^{-1}, \quad (2.24)$$

où  $ON_{\text{eff}}$  est l’ouverture numérique effective de l’objectif de microscope. On obtient une fréquence spatiale d’environ 290 lignes. $\text{mm}^{-1}$  et 455 lignes. $\text{mm}^{-1}$  respectivement expérimentalement et théoriquement, pour une valeur de contraste égale à 0.5. On observe que la courbe expérimentale a une forme plus “creusée” que la courbe théorique. Néanmoins, cette modélisation ne prend pas en compte les aberrations du système optique ou de l’échantillon. Il semblerait qu’ici les aberrations proviennent en majorité du dispositif optique et non de l’échantillon, car les mesures réalisées sur un échantillon mince et dans le cerveau *in vivo* de la drosophile donnent

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

des résultats similaires. Les mesures dans le cerveau de la drosophile ont toutefois été réalisées au niveau de l'extrémité du lobe  $\alpha$  des corps pédonculés qui est une structure proche de la surface. L'imagerie en profondeur dans le cerveau de la drosophile dégrade encore davantage la fonction de transfert optique effective avec la nécessité alors d'implémenter une boucle d'optique adaptative pour rétablir les performances du système de microscopie, ce qui fera l'objet du Chapitre 3.

### 2.2.5.3 Capacité de coupe optique

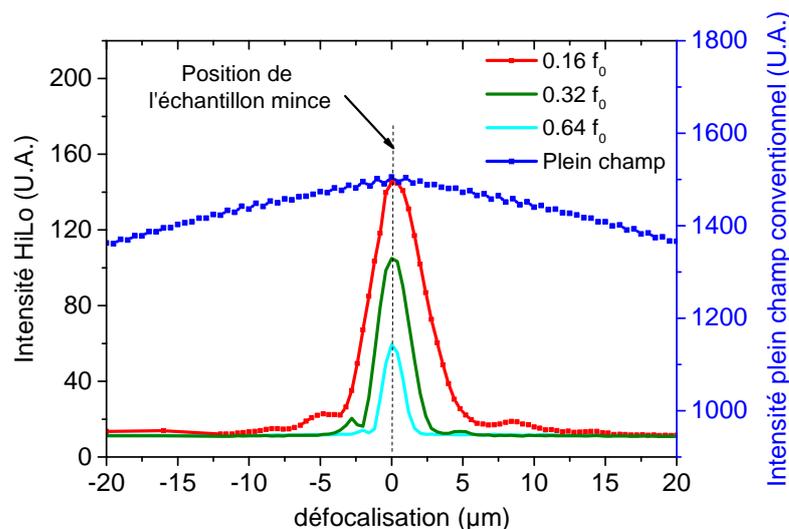


FIGURE 2.30 – Capacité de sectionnement optique de la microscopie HiLo en comparaison de la microscopie plein champ conventionnelle pour différentes valeurs de fréquence spatiale du motif d'illumination. Les fréquences spatiales sont exprimées en fonction de la fréquence de coupure  $f_0$ . Objectif Leica  $40\times 0.8$  ON.

Nous avons également évalué expérimentalement la capacité de sectionnement optique du dispositif HiLo en considérant la variation de l'intensité de l'image HiLo d'un échantillon fluorescent mince avec la défocalisation. Cet échantillon a été réalisé par enduction centrifuge ("spin coating"), sur une lamelle de verre, d'un film de PolyMethylMethAcrylate (PMMA) de concentration massique 1%, dopé avec des molécules de fluorescéine dont les caractéristiques spectrales d'absorption et d'émission sont similaires à celle de la protéine de GFP. L'épaisseur de cette échantillon a été estimé par microscopie à force atomique (AFM) à environ 700 nm. L'imagerie a été réalisée sur 40  $\mu\text{m}$  de course axiale. Les sections optiques obtenues pour différentes fréquences spatiales de motif d'illumination sont représentées sur la figure 2.30 en comparaison de la microscopie plein champ conventionnelle. On constate que la microscopie plein champ conventionnelle ne présente aucun sectionnement optique car l'intensité de fluorescence chute très lentement avec la défocalisation. Ainsi, le signal de fluorescence provenant de l'échantillon mince est ressenti bien au-delà de la position physique de l'échantillon. L'intensité HiLo est maximale lorsque le plan focal de l'objectif coïncide avec l'échantillon fluorescent mince puis

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

---

décroît vers zéro lorsqu'on s'en éloigne. La microscopie HiLo permet alors de retrouver un sectionnement optique indispensable pour l'imagerie d'un échantillon épais. La capacité de section optique en fonction de la fréquence spatiale du motif peut être caractérisée en mesurant la largeur à mi-hauteur des profils d'intensité HiLo. Les résultats, obtenus pour trois fréquences spatiales de motif, sont résumés dans le tableau 2.2. L'épaisseur de la section optique HiLo diminue lorsque sa fréquence spatiale augmente. Néanmoins, on constate que l'intensité HiLo diminue aussi avec la fréquence spatiale du motif. Le choix de la fréquence du motif est alors un compromis entre résolution axiale et rapport signal sur bruit à déterminer en fonction de l'échantillon imagé. Pour un système semi-cohérent, limité par diffraction, l'évolution de la fonction du système optique en fonction de la défocalisation  $z$  s'exprime sous la forme [115] :

$$FTO(z, f) = 2 \left[ 1 - 0.69 \frac{f}{f_0} + 0.0076 \left( \frac{f}{f_0} \right)^2 + 0.043 \left( \frac{f}{f_0} \right)^3 \right] \frac{J_1 \left( \frac{4\pi w n}{\lambda} \frac{f}{f_0} - \frac{2\pi w n}{\lambda} \left( \frac{f}{f_0} \right)^2 \right)}{\frac{4\pi w n}{\lambda} \frac{f}{f_0} - \frac{2\pi w n}{\lambda} \left( \frac{f}{f_0} \right)^2} \\ \times 2 \left[ 1 - 0.69 \frac{f}{2f_0} + 0.0076 \left( \frac{f}{2f_0} \right)^2 + 0.043 \left( \frac{f}{2f_0} \right)^3 \right] \frac{J_1 \left( \frac{4\pi w n}{\lambda} \frac{f}{2f_0} - \frac{2\pi w n}{\lambda} \left( \frac{f}{2f_0} \right)^2 \right)}{\frac{4\pi w n}{\lambda} \frac{f}{2f_0} - \frac{2\pi w n}{\lambda} \left( \frac{f}{2f_0} \right)^2}, \quad (2.25)$$

avec  $w$  s'exprimant sous la forme :

$$w = -\frac{f_{\text{tube}}}{m} - \frac{z}{n} \sqrt{n^2 - ON_{\text{eff}}^2} + \sqrt{\left( \frac{f_{\text{tube}}}{m} \right)^2 + \frac{2z f_{\text{tube}}}{m} + z^2 \left( 1 - \frac{ON_{\text{eff}}^2}{n^2} \right)}, \quad (2.26)$$

où  $J_1$  est la fonction de Bessel du premier ordre,  $f$  est la fréquence spatiale du motif d'illumination,  $f_0$  est la fréquence de coupure,  $f_{\text{tube}}$  correspond à la distance focale de la lentille de tube, égale dans notre cas à 20 cm,  $n$  est l'indice de réfraction du milieu d'immersion,  $ON_{\text{eff}}$  est l'ouverture effective de l'objectif de microscope et  $m$  est le grandissement de l'objectif. On remarque que si  $f$  vaut 0, correspondant à une absence de grille, alors  $FTO(z, f)$  est une constante ce qui est en accord avec la théorie de la microscopie plein champ conventionnelle pour laquelle une illumination uniforme est utilisée.

$f/f_0$	$FWHM$ mesurée (en $\mu\text{m}$ )	$FWHM$ de la fonction $FTO(z, f)$ (en $\mu\text{m}$ )
0.16	3.9	4
0.32	2.1	1.6
0.64	1.2	0.7

Tableau 2.2 – Tableau récapitulatif des largeurs à mi-hauteur  $FWHM$  mesurées et de la fonction  $FTO(z, f)$  théorique pour trois fréquences spatiales de motif d'illumination :  $0.16f_0$ ,  $0.32f_0$  et  $0.64f_0$ . Les valeurs de  $FWHM$  mesurées tiennent compte de la déconvolution par l'épaisseur de l'échantillon mince (700 nm). Objectif Leica 40 $\times$ . Le calcul a été fait pour une ouverture numérique effective de 0.7.

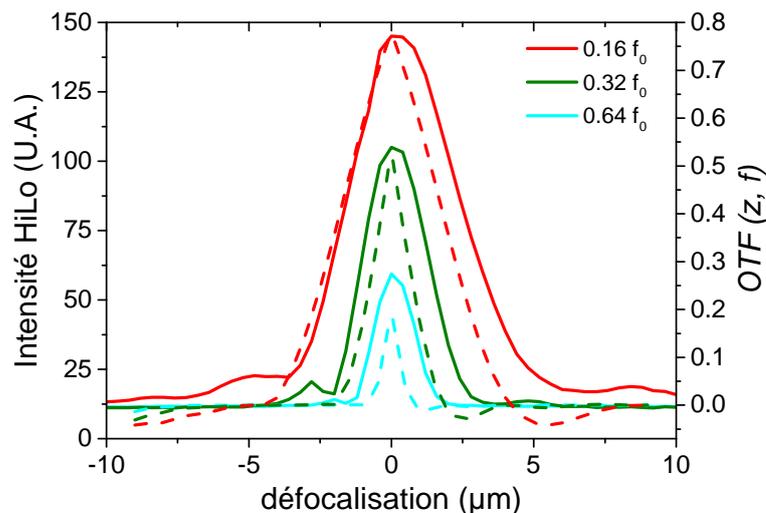


FIGURE 2.31 – Évolution de l'intensité HiLo (en trait plein, échelle de gauche) et de la fonction de transfert optique  $FTO$  calculée grâce à la formule 2.25 (en trait pointillé, échelle de droite) pour trois fréquences spatiales de motif d'illumination :  $0.16f_0$ ,  $0.32f_0$  et  $0.64f_0$ .

Cette fonction est représentée sur la figure 2.31. L'épaisseur de la coupe optique est alors la largeur à mi-hauteur de cette fonction. On obtient des valeurs théoriques de sections optiques égales à  $0.7 \mu\text{m}$ ,  $1.6 \mu\text{m}$  et  $4 \mu\text{m}$  respectivement pour des fréquences spatiales de  $0.16f_0$ ,  $0.32f_0$  et  $0.64f_0$  qui sont assez proches des valeurs expérimentales. Plus la fréquence spatiale du motif d'illumination est élevée, plus la section optique obtenue est fine car la transmission des composantes hautes fréquences spatiales décroît plus rapidement avec la défocalisation (en théorie, le sectionnement optique optimal est obtenu pour un motif de fréquence spatiale égale à la moitié de la fréquence de coupure [120]). Ainsi, le motif ne modulera effectivement qu'une section de très faible épaisseur autour du plan de mise au point. Néanmoins, comme montré précédemment (figure 2.29), plus la fréquence spatiale du motif se rapproche de la fréquence de coupure du système optique, plus son contraste diminue. Ainsi, le nombre de photons provenant de la section contribuant à l'image finale reconstruite diminue, conduisant à une dégradation du rapport signal sur bruit. Un compromis entre épaisseur de coupe et contraste de motif significatif doit alors être trouvé. Pour nos applications, des motifs de fréquence spatiale environ égale au tiers de la fréquence de coupure conviennent, donnant une capacité de section optique d'environ  $2 \mu\text{m}$ .

#### 2.2.5.4 Réjection des basses fréquences spatiales hors mise au point

Afin d'évaluer la qualité de reconstruction par microscopie HiLo d'un objet tridimensionnel, nous avons imagé des billes fluorescentes vertes de diamètre  $2 \mu\text{m}$ . La dimension latérale des billes mesurée en microscopie plein champ et en microscopie HiLo est identique et égale à  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ . Les coupes et profils axiaux des billes fluorescentes sont donnés à la figure 2.32. La taille de la bille étant bien supérieure à la limite de diffraction, on observe clairement une réjec-

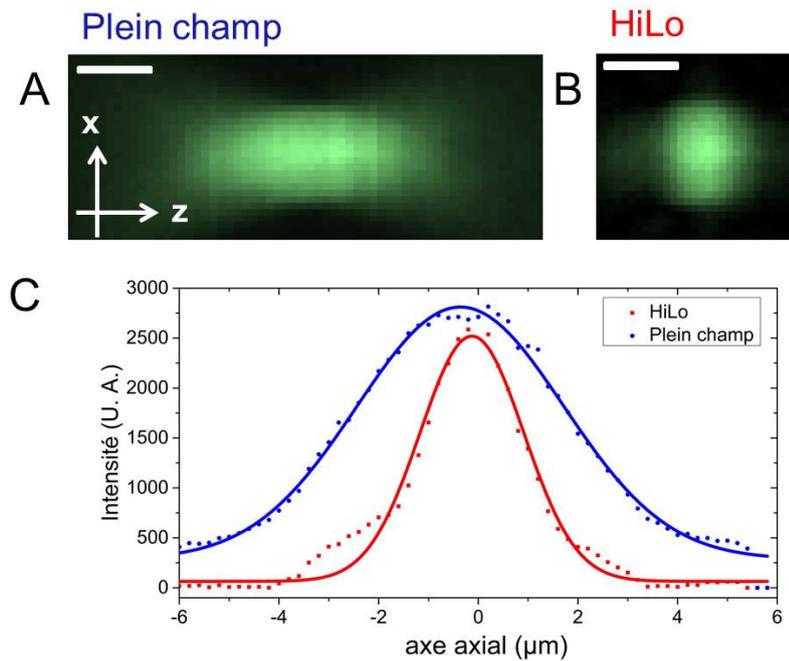


FIGURE 2.32 – Imagerie plein champ et HiLo d’une bille fluorescente de diamètre  $2 \mu\text{m}$ . (A) Coupe axiale plein champ. (B) Coupe axiale HiLo. Pour (A) et (B), la barre d’échelle correspond à  $2 \mu\text{m}$ . (C) Profils axiaux d’intensité pour les microscopies plein champ et HiLo. La fréquence spatiale du motif d’illumination utilisée pour la reconstruction HiLo est  $0.64f_0$  ce qui correspond à des lignes de période 4 pixels sur la matrice de micro-miroirs et environ 8 pixels sur le capteur CMOS. Objectif Leica  $40\times$ .

tion de la fluorescence provenant des plans hors mise au point sur l’image HiLo (figure 2.32B). Des modélisations gaussiennes donnent des valeurs de largeur à mi-hauteur du profil axial d’intensité de  $5.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$  et  $2.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$  respectivement pour les microscopies plein champ conventionnelle et HiLo. La microscopie HiLo permet alors de résoudre correctement la bille fluorescente de diamètre  $2 \mu\text{m}$  en trois dimensions. Ces billes test ont été choisies car elles ont une taille correspondant à celle des structures typiques au niveau des corps cellulaires des corps pédonculés de la drosophile.

## 2.3 Résultats : Microscopie Hilo pour l’imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

Les performances du dispositif optique ont été évaluées grâce à des échantillons modèles comme des billes ou des échantillons minces fluorescents. Ces expérimentations ont prouvé que la microscopie HiLo présente le grand intérêt de rejeter les photons qui ne proviennent pas du plan de mise au point, ce qui est indispensable pour l’imagerie d’échantillons biologiques épais. Son caractère plein champ lui permet de réaliser ce sectionnement optique très rapidement contrairement aux techniques à balayage comme la microscopie confocale. Cette partie consiste à prouver que le dispositif optique est adapté à l’imagerie du cerveau de la drosophile. Je ne

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

parlerai ici que d'imagerie morphologique. L'imagerie fonctionnelle par microscopie HiLo est développée plus particulièrement dans le Chapitre 5 où elle est utilisée pour suivre l'activité cérébrale au niveau des corps pédonculés de la drosophile en réponse à une stimulation de type électrique.

### 2.3.1 Lignées transgéniques de drosophiles

Deux lignées transgéniques de drosophiles exprimant la protéine fluorescente GFP ont été imagées : *238y-GAL4, UAS-GFP-NLS/+* et *238y-GAL4, UAS-CD8-GFP/+*. La GFP-NLS (NLS : Nuclear Localization Signal) est exprimée dans les noyaux tandis que la CD8-GFP (CD8 : Cluster of Differentiation 8) s'exprime dans le cytoplasme. Le pilote d'expression *238Y-GAL4* correspond au marquage de l'ensemble des cellules de Kenyon. Les drosophiles sont préparées à l'imagerie comme présenté dans la section 1.4 du Chapitre 1.

### 2.3.2 La capacité de sectionnement optique de la microscopie HiLo

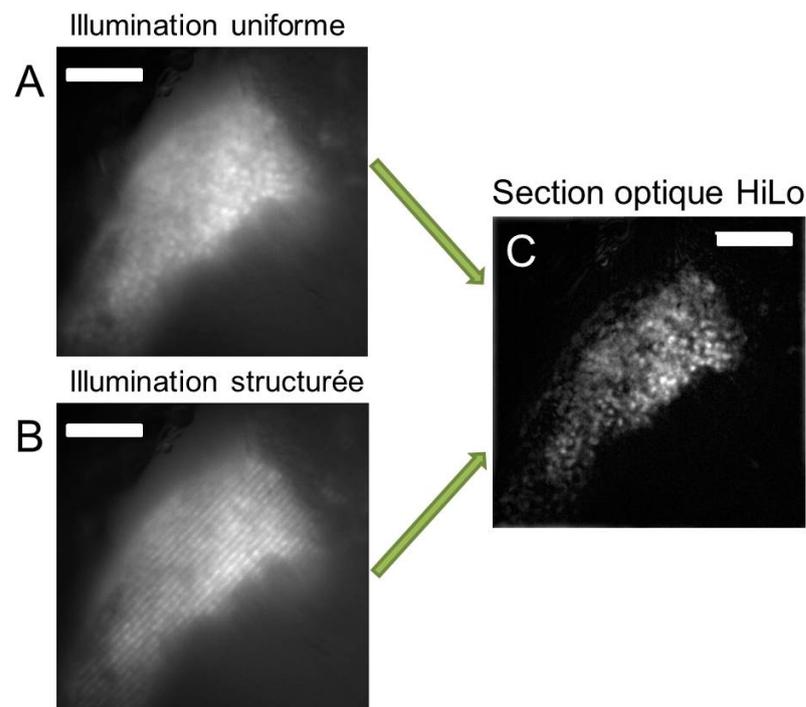


FIGURE 2.33 – Imagerie de fluorescence des corps cellulaires des cellules de Kenyon d'une drosophile exprimant la protéine de GFP nucléaire. (A) Image prise en illumination uniforme. (B) Image prise en illumination structurée. Le motif d'illumination est constitué de franges de fréquence spatiale  $0.32f_0$ . (C) Reconstruction de la section optique HiLo. Barre d'échelle :  $20 \mu\text{m}$ . Objectif Leica  $40 \times$ .

L'imagerie a été réalisée au niveau de la fraction des corps cellulaires des cellules de Kenyon située en surface (pour la localisation des corps cellulaires, on peut se référer à la figure 1.3 du Chapitre 1). La figure 2.33A, obtenue en illumination uniforme correspond à la microscopie

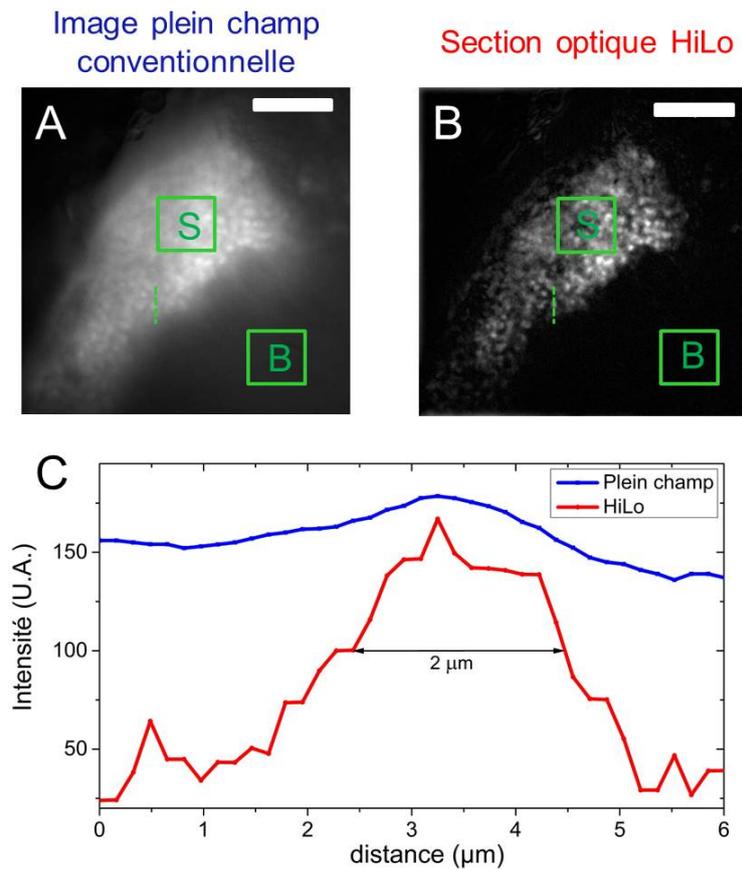


FIGURE 2.34 – Comparaison de la microscopie plein champ conventionnelle et de la microscopie HiLo. (A) Image plein champ conventionnelle. Rapport signal à bruit : 4.5. (B) Image HiLo reconstruite. Rapport signal à bruit : 30. La fréquence spatiale du motif d’illumination utilisé pour la reconstruction HiLo présentée est  $0.32f_0$ . Barre d’échelle :  $20 \mu\text{m}$ . Objectif Leica  $40\times$ . (C) Profils d’intensité du noyau d’un corps cellulaire. Les profils sont effectués le long des traits tracés en (A) et (B). Le rapport signal sur bruit est défini ici comme  $(\langle I \rangle_{\text{zone S}} - \langle I \rangle_{\text{zone B}}) / \langle I \rangle_{\text{zone B}}$  où  $\langle I \rangle_{\text{zone}}$  correspond à l’intensité moyenne de l’image dans la zone concernée (représentée par des carrés verts).

plein champ conventionnelle. L’absence de capacité de sectionnement optique de cette technique conduit à la formation d’une image floue. L’image du même plan prise en illumination structurée est montrée à la figure 2.33B. Cette image est également brouillée par les composantes basses fréquences spatiales provenant des plans hors mise au point. Néanmoins, en combinant grâce à l’optique de Fourier les deux images obtenues en illumination uniforme et en illumination structurée, comme expliqué dans la section 2.2.3.2, on peut reconstruire une section optique (figure 2.33C). Comme montré sur la figure 2.34, les composantes basses fréquences spatiales, provenant des zones de l’échantillon marquées avec la molécule fluorescente de GFP hors plan de mise au point, sont efficacement rejetées. Le rapport signal sur bruit du plan imagé est alors significativement augmenté entre la microscopie plein champ conventionnelle et la microscopie HiLo. La sonde fluorescente GFP-NLS est exprimée dans les noyaux des neurones d’une taille

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

typique de  $2 \mu\text{m}$ . Ces noyaux sont bien résolus avec la microscopie HiLo (figure 2.34C). On retrouve ici *in vivo* le résultat obtenu pour l'imagerie de billes fluorescentes de  $2 \mu\text{m}$ . L'impact sur la cadence d'acquisition de ce gain en sectionnement optique est uniquement d'un facteur 2 en comparaison de la microscopie conventionnelle puisque la reconstruction nécessite la prise de deux images d'un même plan. Ce sectionnement optique et rapide est une caractéristique indispensable pour l'imagerie fonctionnelle *in vivo* et notamment pour la quantification de processus biologiques, comme il sera montré au Chapitre 5.

### 2.3.3 Microscopie plein champ HiLo et microscopie confocale à balayage

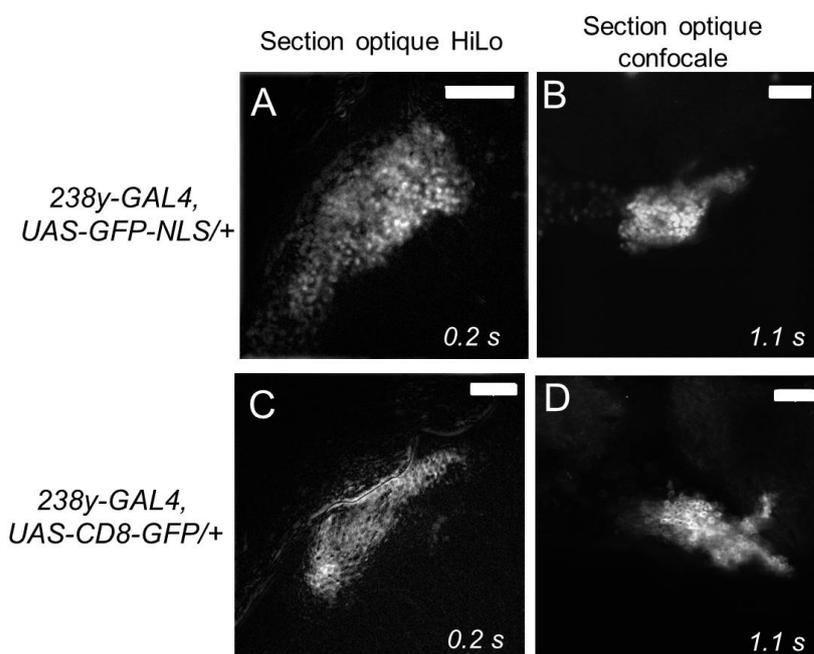


FIGURE 2.35 – Imagerie HiLo et confocale des corps cellulaires de drosophiles exprimant la protéine fluorescente GFP. (A) Marquage des noyaux (GFP-NLS) et imagerie HiLo. (B) Marquage des noyaux et imagerie confocale. (C) Marquage des membranes plasmiques (CD8-GFP) et imagerie HiLo. (D) Marquage des membranes plasmiques et imagerie confocale. La fréquence spatiale utilisée pour la structuration de l'illumination pour l'imagerie HiLo est  $0.32 f_0$ . Barre d'échelle :  $20 \mu\text{m}$ . Le temps indiqué sur chacune des images correspond à la durée d'exposition.

La microscopie confocale est la technique de référence pour l'imagerie neurobiologique chez la drosophile [25, 116]. Nous avons alors comparé les images obtenues par microscopie HiLo avec des images enregistrées avec un microscope confocal (Olympus Fluoview FV1000). Les noyaux sont bien résolus avec la microscopie HiLo (figure 2.35A) ainsi qu'en microscopie confocale (figure 2.35B). Les images, présentées sur les figures 2.35C et D, correspondent au marquage des membranes plasmiques des cellules Kenyon avec la protéine fluorescente GFP. Il s'agit

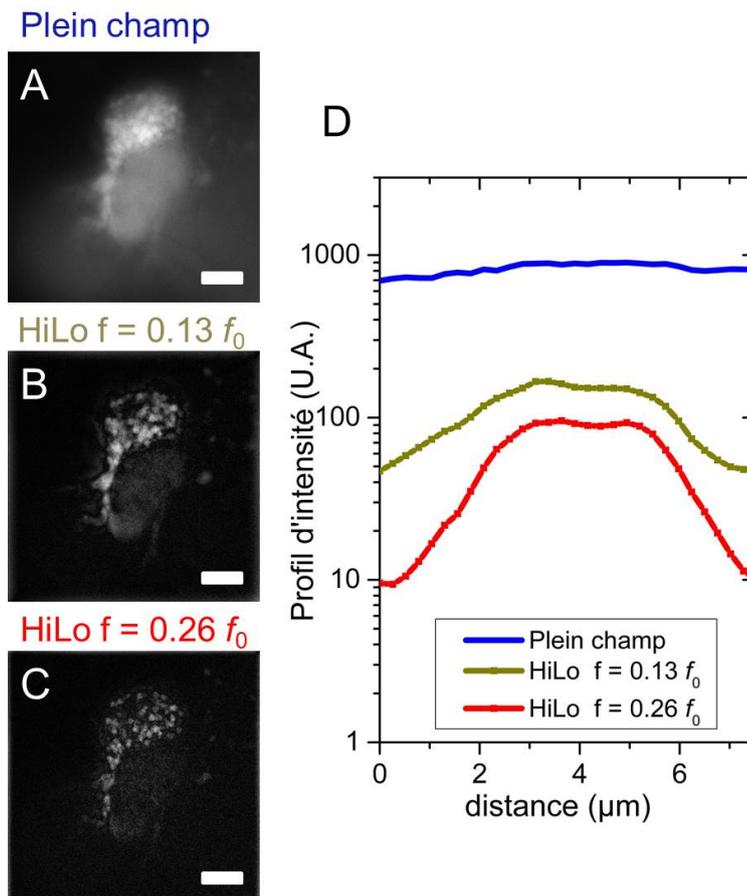


FIGURE 2.36 – Imagerie plein champ et HiLo, pour deux fréquences spatiales de motif d’illumination, des corps cellulaires de drosophiles exprimant la protéine fluorescente GFP nucléaire. (A) Imagerie plein champ conventionnelle. (B) Imagerie HiLo pour une fréquence spatiale de motif égale à  $0.13 f_0$ . (C) Imagerie HiLo pour une fréquence spatiale de motif égale à  $0.26 f_0$ . (D) Profil d’intensité le long du noyau de l’un des neurones pour les microscopies plein champ et HiLo. La taille du champ imagé est  $133 \times 133 \mu\text{m}$ . Barre d’échelle :  $20 \mu\text{m}$ . Objectif Leica  $25 \times$ .

du marquage complémentaire du marquage nucléaire présenté précédemment. Malgré des résolutions spatiales comparables, en imagerie *in vivo* de surface, les microscopies confocale et HiLo présentent des dynamiques d’acquisition des images extrêmement différentes. Ainsi par exemple, l’acquisition d’images, de taille  $512 \times 512$  pixels, nécessitent 200 millisecondes pour la microscopie HiLo (100 millisecondes pour chaque type d’illumination) et 1100 millisecondes pour la microscopie confocale, qui est intrinsèquement limitée temporellement par le balayage. Pour suivre des réponses fonctionnelles neurobiologiques *in vivo* en “temps réel”, la fréquence d’acquisition du microscope confocal est réellement une limitation. Une parallélisation de la microscopie confocale, appelée microscopie multiconfocale, a connu un grand développement technologique ces dernières années et fait l’objet du Chapitre 4. En microscopie HiLo, la cadence d’acquisition n’est pas limitée par la prise de l’image, car il s’agit d’une technique plein champ, mais par le rapport signal sur bruit de l’image reconstruite. La figure 2.36 présente deux

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

reconstructions HiLo avec des fréquences spatiales de motif d'illumination différentes obtenues pour un temps de pause de 10 ms. Le profil d'intensité a été tracé le long du noyau de l'un des neurones. On remarque là encore que l'image plein champ conventionnelle est très brouillée tandis que les images HiLo permettent de retrouver une capacité de sectionnement optique. La figure 2.36D montre que la capacité de sectionnement optique dépend de la fréquence spatiale du motif d'illumination utilisé. Comme il a été présenté sur un échantillon mince modèle dans la section 2.2.5.3, un motif de fréquence spatiale  $0.26 f_0$  est plus efficace, en termes de sectionnement optique, qu'un motif de fréquence  $0.13 f_0$ .

### 2.3.4 Adaptation de la fréquence spatiale du motif d'illumination pour l'imagerie HiLo tridimensionnelle.

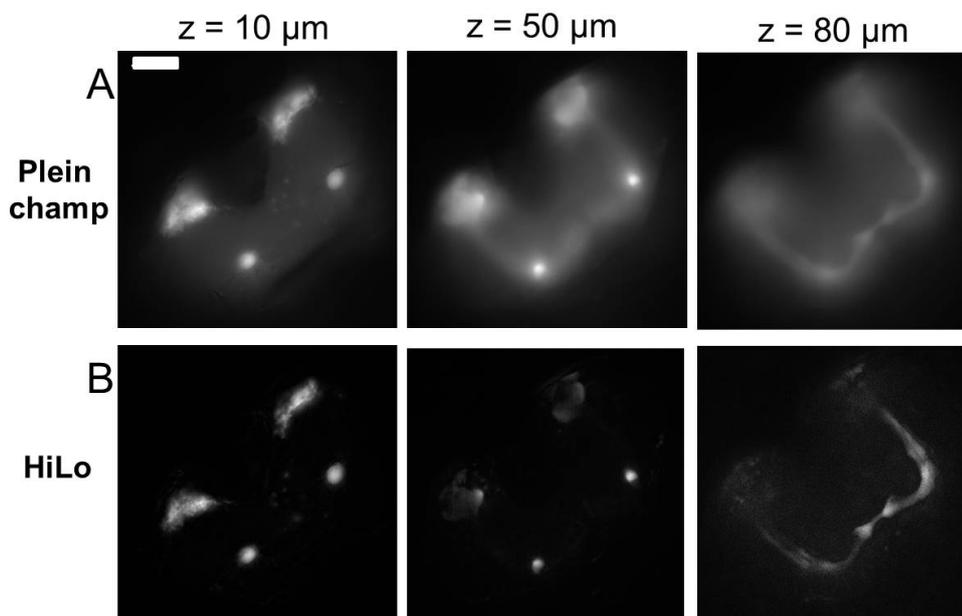


FIGURE 2.37 – Imagerie plein champ et HiLo de l'ensemble des corps pédonculés d'une drosophile exprimant la protéine fluorescente GFP pour différentes profondeurs dans le cerveau : 10, 50 et  $80 \mu\text{m}$ . (A) Imagerie plein champ conventionnelle. (B) Imagerie HiLo pour une fréquence spatiale de motif égale à  $0.10 f_0$ . Par souci de visibilité, l'échelle d'intensité de l'image prise à  $80 \mu\text{m}$  a été ajustée. La taille du champ imagé est  $340 \times 340 \mu\text{m}$ . Barre d'échelle :  $50 \mu\text{m}$ . Objectif Leica  $25 \times$ .

Les images précédemment présentées ont été acquises en surface du cerveau. Afin de suivre l'activité neuronale de la drosophile, il est important de ne pas être limité à l'imagerie superficielle des neurones des corps pédonculés. Les figures 2.37 et 2.38 présentent des comparaisons entre imagerie plein champ conventionnelle et imagerie HiLo pour différentes profondeurs d'observation. La modulation du motif d'illumination n'est pas aussi efficace en surface et à  $80 \mu\text{m}$  de profondeur dans le cerveau de la drosophile. La figure 2.39 présente le résultat de reconstruction HiLo à  $80 \mu\text{m}$  de profondeur, pour différentes fréquences spatiales de motif d'illumination

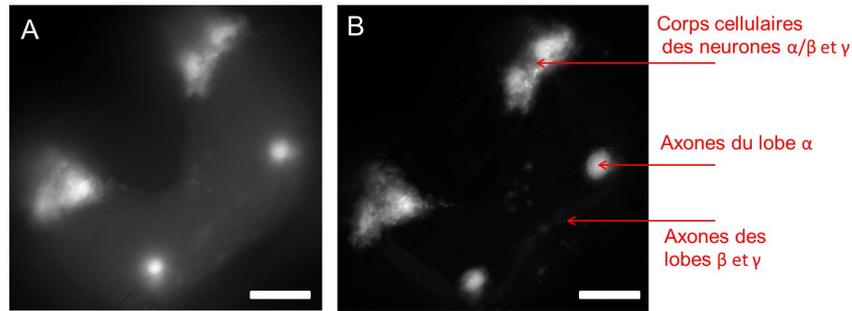


FIGURE 2.38 – Projection maximale d’intensité sur  $80 \mu\text{m}$  de profondeur, en microscopie plein champ conventionnelle et HiLo. L’ensemble des corps pédonculés d’une drosophile exprimant la protéine fluorescente GFP sont imagés. (A) Projection plein champ. (B) Projection HiLo pour une fréquence spatiale de motif égale à  $0.10 f_0$ . La taille du champ imagé est  $265 \times 265 \mu\text{m}$ . Barre d’échelle :  $50 \mu\text{m}$ . Objectif Leica  $25 \times$ .

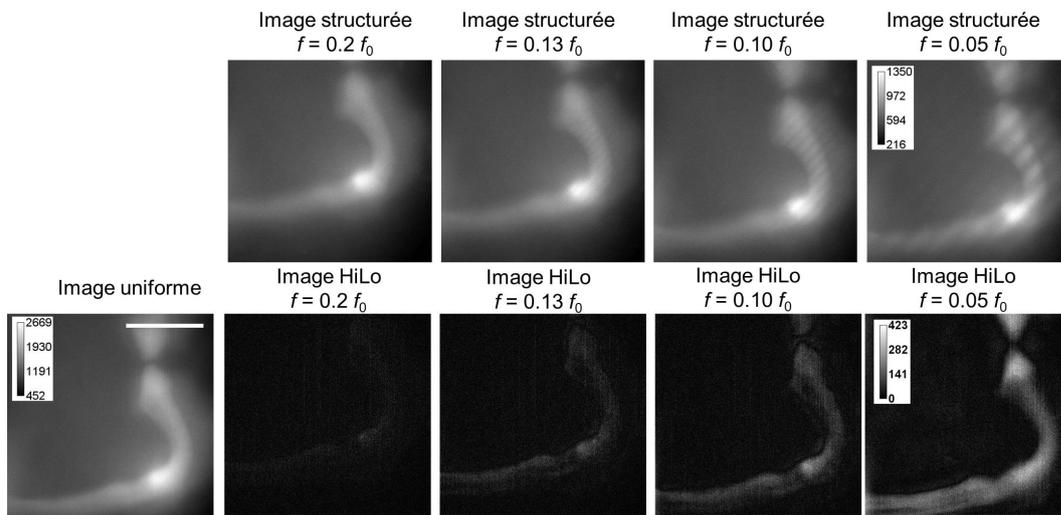


FIGURE 2.39 – Imagerie du lobe  $\beta$  à  $80 \mu\text{m}$  de profondeur en microscopie plein champ conventionnelle et HiLo. Les images structurées ainsi que les reconstructions HiLo sont données pour différentes fréquences spatiales de motif d’illumination  $f$  :  $0.20 f_0$ ,  $0.13 f_0$ ,  $0.10 f_0$ ,  $0.05 f_0$ . Images  $512 \times 512$  pixels. La taille du champ imagé est  $133 \times 133 \mu\text{m}$ . Barre d’échelle :  $50 \mu\text{m}$ . Objectif Leica  $25 \times$ .

allant de  $0.05 f_0$  à  $0.20 f_0$ . L’impression du motif de fréquence spatiale  $0.20 f_0$  est très mauvaise à  $80 \mu\text{m}$  de profondeur conduisant à une reconstruction HiLo de qualité médiocre. En effet, la reconstruction HiLo est basée sur l’utilisation du motif d’illumination qui joue le rôle de “porteuse” optique. Si cette dernière est très peu contrastée, alors les composantes basses fréquences spatiales du plan de mise au point ne sont pas efficacement récupérées. Pour reconstruire des sections HiLo avec un meilleur rapport signal sur bruit, il est nécessaire de diminuer la fréquence spatiale du motif. Cette diminution de la fréquence spatiale, qui permet de réaliser du sectionnement optique HiLo à  $80 \mu\text{m}$  de profondeur dans le cerveau, conduit toutefois à une augmentation de l’épaisseur de la coupe optique. La perte du contraste du motif d’illumination

est due au caractère diffusif et aberrant du cerveau. Ainsi, afin d'imager en profondeur dans le cerveau en conservant la même capacité de coupe optique sur toute l'épaisseur, c'est-à-dire en utilisant la même fréquence spatiale de motif, il est nécessaire d'implémenter une boucle d'optique adaptative pour corriger les aberrations optiques introduites par la traversée du milieu biologique. Le couplage de l'optique adaptative à la microscopie de fluorescence HiLo fait l'objet du Chapitre 3.

## 2.4 Discussion

### 2.4.1 La microscopie HiLo, une technique de coupe optique plein champ limitée par diffraction

La microscopie HiLo est une technique de microscopie plein champ dont le but est de permettre une capacité de coupe optique. Elle ne requiert que la prise de deux images du même plan de mise au point contrairement à la technique introduite par T. Wilson [99]. Le traitement des données est effectué dans l'espace de Fourier sur les fréquences spatiales. Les performances obtenues avec notre dispositif se rapprochent des performances limitées par la diffraction avec une résolution latérale de 550 nm (figure 2.26). La résolution axiale dans un tel échantillon tridimensionnel est majoritairement dictée par la capacité de sectionnement optique du microscope. La microscopie à illumination structurée de type HiLo n'est pas une technique de superrésolution et sa résolution est donc principalement limitée par l'ouverture numérique de l'objectif. Sa vocation première est en effet de permettre une capacité de sectionnement optique plein champ dans un échantillon épais, en assignant une signature spectrale aux photons de fluorescence provenant du plan de mise au point afin de rejeter les contributions hors plan de focalisation. Le principe de fonctionnement de la technique HiLo est donc extrêmement différent de celui d'autres techniques de microscopie à illumination structurée, comme celle introduite par M. Gustafsson en 2000 [117]. Dans ce type de microscopie, le but est d'élargir l'espace fréquentiel accessible afin d'accéder à des fréquences spatiales plus élevées, qui se traduisent dans le domaine spatial par des détails plus fins (équation 2.9). Lors de l'illumination de l'échantillon avec une grille, les hautes fréquences spatiales de l'échantillon, qui étaient non accessibles car supérieures à la fréquence de coupure du microscope, se retrouvent encodées à une fréquence spatiale plus basse grâce à l'effet Moiré, comme représenté sur la figure 2.40A.

Dans l'espace de Fourier, la modulation a pour effet de translater la distribution de fréquences de l'échantillon de part et d'autre de l'origine d'une quantité égale à la fréquence spatiale du motif de modulation. Une partie des hautes fréquences de l'échantillon se retrouve alors déplacée dans la bande passante du microscope ( $< f_0$ ). (figure 2.40B). Pour que le gain en résolution ne soit pas négligeable, le motif d'illumination doit être choisi avec une fréquence spatiale proche de la fréquence spatiale de coupure du microscope  $f_0$ . Pour une fréquence de motif  $f_g$  égale à la fréquence de coupure, le gain en résolution latérale, apporté par l'illumination structurée en régime linéaire, atteint un facteur 2 [117, 118]. Pour dépasser ce facteur, il faut recourir à une technique, appelée microscopie à illumination structurée saturée (SSIM), où la saturation des fluorophores conduit à la déformation du motif d'illumination et fait apparaître les harmoniques de la fréquence de modulation. Plus le nombre d'harmoniques détectées

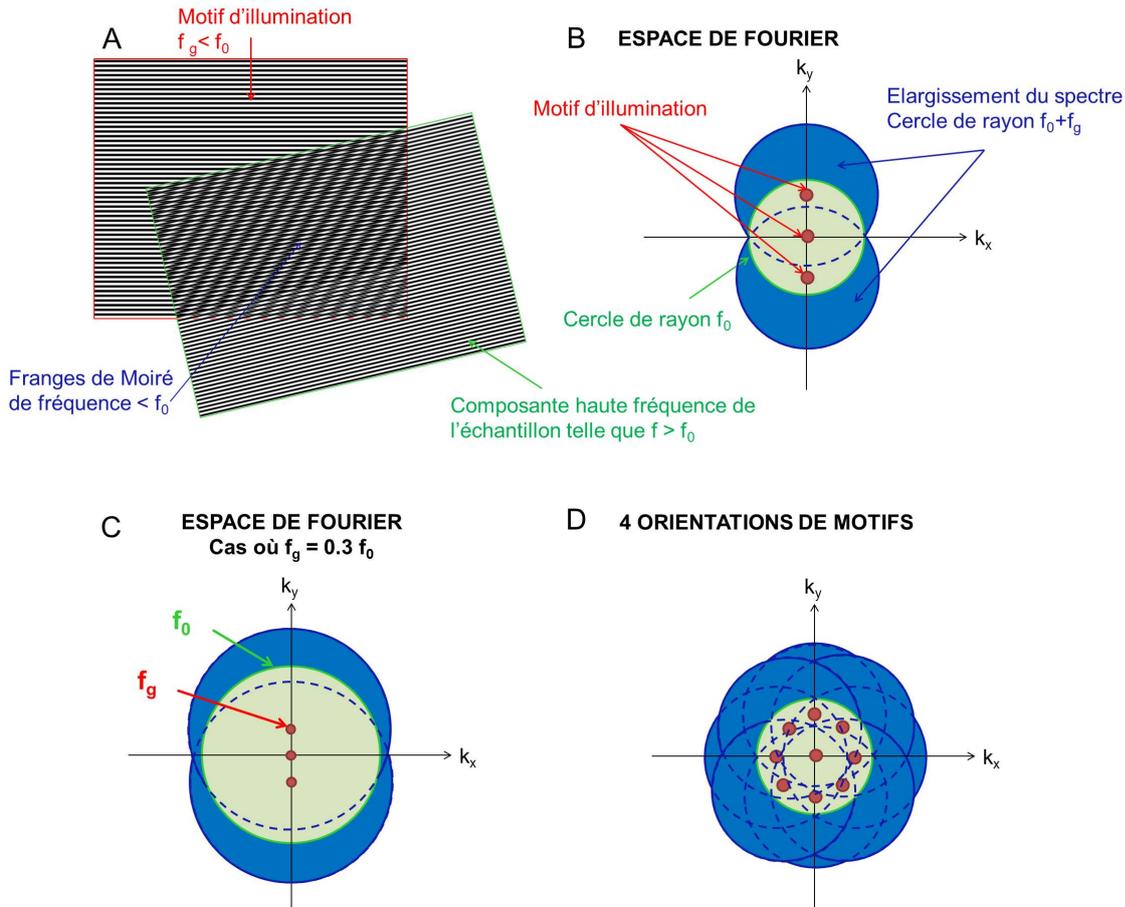


FIGURE 2.40 – (A) Représentation schématique du principe de fonctionnement de l’illumination structurée pour la microscopie de superrésolution. La combinaison du motif d’illumination de fréquence  $f_g$  avec des fréquences spatiales de l’échantillon supérieures à la fréquence de coupure  $f_0$  produit un effet de battement appelé franges de Moiré dont la fréquence spatiale est inférieure à la fréquence de coupure  $f_0$ . (B) Représentation dans l’espace de Fourier du principe de la microscopie à illumination structurée de superrésolution. Le motif d’illumination, dans cet exemple, étant orienté selon l’axe horizontal, les fréquences spatiales dans l’espace de Fourier correspondant à ce motif sont selon en  $\pm f_g$  sur l’axe  $y$ . (C) Représentation de l’espace de Fourier dans le cas où  $f_g \simeq 0.3 f_0$ . (D) Représentation dans l’espace de Fourier de l’élargissement du spectre obtenu dans le cas où quatre images du même plan sont prises avec des orientations du motif d’illumination différentes.

est grand, meilleure est la résolution spatiale du microscope [119]. Néanmoins, cela nécessite une puissance lumineuse d’excitation très importante. En pratique, dans notre cas, pour l’imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile en surface, seuls des motifs de fréquence spatiale de typiquement  $0.3 f_0$  maximum ont un contraste suffisant pour être utilisés. Ainsi cela limiterait l’extension de la gamme spectrale accessible (figure 2.40C) et donc le gain en termes de résolution spatiale latérale. De plus, afin de rendre cet effet isotrope, il faut utiliser, pour une même fréquence spatiale du motif d’illumination, différentes orientations et donc multiplier les prises de vue d’un même plan de l’échantillon, ce qui limite la cadence d’acquisition (figure 2.40D).

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

---

Pour notre application d'imagerie dynamique des neurones des corps pédonculés, c'est principalement le fait que l'échantillon soit très épais optiquement, et donc que la fluorescence ne provienne pas d'un unique plan, qui limite l'imagerie quantitative. Ainsi, nous avons opté pour une technique de microscopie d'illumination structurée non pour réaliser de la superrésolution plein champ, mais en vue d'un sectionnement optique. La microscopie HiLo ne permet en effet pas d'améliorer le contenu hautes fréquences spatiales de l'image finale. Nous avons montré l'efficacité du sectionnement optique de la technique HiLo sur des échantillons minces modèles (figure 2.30), en surface dans le cerveau de la drosophile pour l'imagerie de fluorescence des corps cellulaires des cellules de Kenyon (figure 2.34) et un peu plus en profondeur (figure 2.37) pour l'imagerie des projections axonales, tout en se rapprochant des performances de résolution spatiale de la microscopie confocale (figure 2.35). Cette capacité de sectionnement optique à haute cadence sera pleinement exploitée pour les expériences présentées dans la section 5.4 du Chapitre 5.

### 2.4.2 Choix du motif d'illumination et des paramètres de reconstruction de la microscopie HiLo

L'efficacité de la technique HiLo, qui permet de conférer à la microscopie plein champ une capacité de sectionnement optique, repose sur le choix d'un motif d'illumination adapté. L'épaisseur de la coupe optique varie en fonction de la fréquence du motif d'illumination : plus la fréquence de la "porteuse optique" est basse, plus la coupe optique est épaisse (figure 2.31 et tableau 2.2) ce qui impacte le contraste des images au niveau des corps cellulaires des neurones par imagerie HiLo (figure 2.36). L'optimum de coupe optique est obtenue pour une fréquence de modulation égale à la moitié de la fréquence de coupure du microscope [99, 120]. Néanmoins, à cette fréquence, pour nos échantillons optiquement épais et aberrants, le contraste du motif est faible (figure 2.21). Pour une configuration de microscope avec une ouverture numérique d'objectif fixée, le choix de la fréquence spatiale du motif dépend principalement de l'échantillon. En pratique, la fréquence du motif d'illumination est alors déterminée en faisant un compromis entre l'épaisseur de la section optique souhaitée et le rapport signal sur bruit de l'image finale. C'est également le cas en microscopie confocale où l'ouverture du trou de filtrage permet certes de récupérer plus de photons de fluorescence mais impacte la qualité de la section optique. Typiquement, pour l'imagerie HiLo, réalisée en surface, j'ai utilisé des motifs de fréquence spatiale égale au tiers de la fréquence de coupure du microscope, donnant une épaisseur de coupe de l'ordre de  $2 \mu\text{m}$  (tableau 2.2). L'utilisation d'une matrice de micro-miroirs pour façonner le faisceau d'excitation est d'une grande utilité puisqu'elle permet de faire varier facilement la fréquence spatiale du motif d'illumination sur une grande gamme de fréquences, afin de l'adapter au mieux à l'échantillon.

La technique HiLo est basée sur un algorithme de reconstruction dans l'espace de Fourier. La largeur des filtres utilisés ainsi que le facteur de reconstruction  $\eta$  sont des paramètres qui influent sur la qualité de l'image reconstruite. La microscopie à illumination structurée pour le sectionnement optique, telle que celle développée par T. Wilson [99] et présentée dans la section 2.2.2, ne requiert aucun paramètre pour la reconstruction de l'image finale à partir des

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

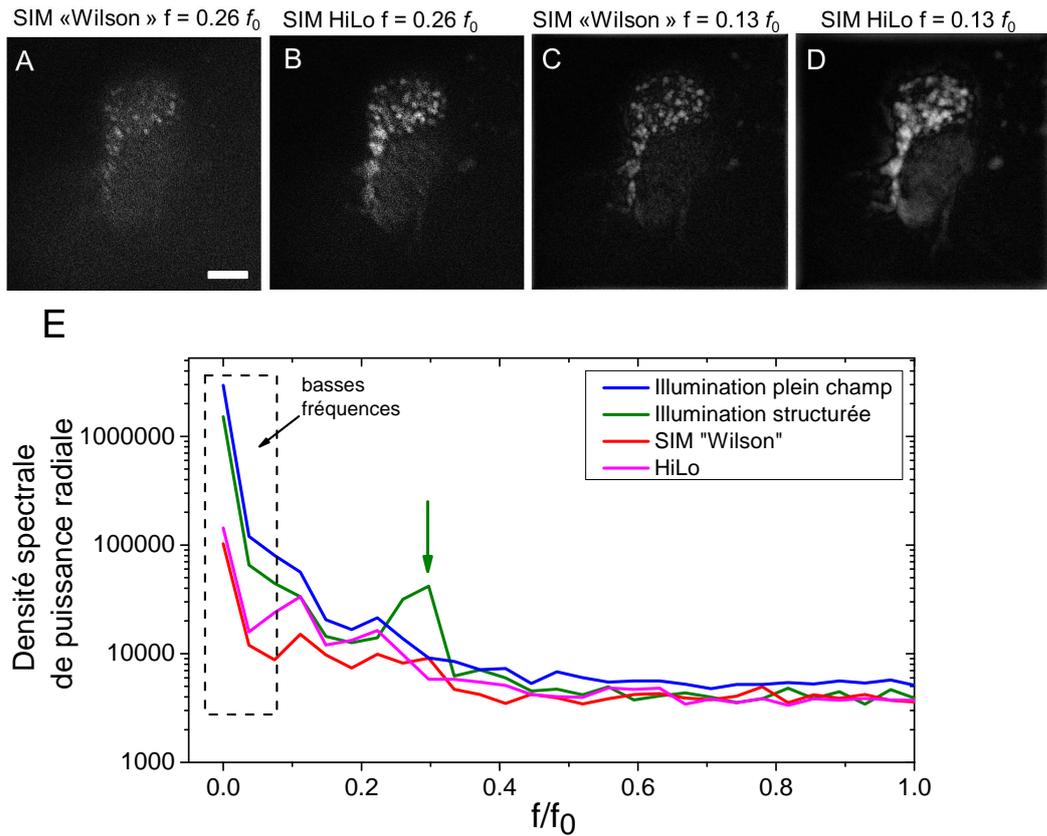


FIGURE 2.41 – Imagerie HiLo et microscopie à illumination structurée (SIM) telle que développée par T. Wilson [99], pour deux fréquences spatiales de motif d’illumination. La zone imagée correspond aux corps cellulaires des cellules de Kenyon d’une drosophile exprimant la protéine fluorescente GFP nucléaire. (A) Imagerie SIM.  $f = 0.26f_0$ . Barre d’échelle :  $20 \mu\text{m}$ . (B) Imagerie HiLo.  $f = 0.26f_0$ . (C) Imagerie SIM.  $f = 0.26f_0$ . (D) Imagerie HiLo.  $f = 0.26f_0$ . (E) Moyenne radiale de la densité spectrale de puissance (carré du module de la transformée de Fourier) en échelle logarithmique des images prises en illuminations uniforme, structurée et des sections reconstruites avec la technique HiLo ou par microscopie à illumination structurée développée par T. Wilson. La flèche correspond à la fréquence spatiale du motif, ici  $0.26f_0$  où  $f_0$  est la fréquence de coupe du microscope.

trois images prises du même plan, avec un motif d’illumination déphasé d’un tiers de période. Cette technique permet, à fréquence spatiale de modulation égale, un sectionnement optique sensiblement équivalent à l’imagerie HiLo. L’expérience a été réalisée sur un échantillon mince pour deux valeurs de fréquence spatiale de modulation égales à  $0.13f_0$  et  $0.26f_0$  et un écart de 15% a été observé entre leur capacité de coupe optique par détermination de l’extension axiale de la distribution de fluorescence mesurée. Ainsi, les images obtenues dans le cerveau de la drosophile avec ces deux techniques sont comparables (figures 2.41A à D). Ces deux types de microscopies ont pour vocation de rejeter les basses fréquences spatiales hors plan de mise au point ce qui est illustré sur la figure 2.41E. En effet, les composantes basses fréquences spatiales des deux types de reconstruction sont fortement diminuées par rapport à celles des

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

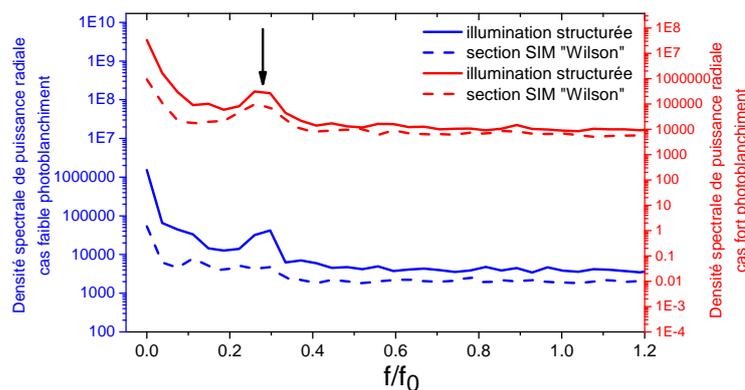


FIGURE 2.42 – Moyenne radiale de la densité spectrale de puissance en échelle logarithmique des images prises en illumination structurée (trait plein) et des sections reconstruites par microscopie à illumination structurée développée par T. Wilson (trait pointillé) dans deux cas : faible photoblanchiment (courbes bleues) et fort photoblanchiment (courbes rouges). La flèche correspond à la fréquence spatiale du motif, ici  $0.26f_0$  où  $f_0$  est la fréquence de coupure du microscope.

images prises en illumination uniforme ou en illumination structurée qui ne sont pas des sections optiques. Du fait de la simplicité de la reconstruction, par soustraction d'images pixel à pixel dans l'espace réel, cette technique peut souffrir d'artefacts. Par exemple, il peut rester des franges résiduelles dans l'image reconstruite si la phase entre les différents motifs n'est pas parfaitement contrôlée ou si l'intensité fluctue d'une image à l'autre ce qui est le cas si la source d'excitation n'est pas parfaitement stable ou si se produit du photoblanchiment au sein de l'échantillon. La figure 2.42 présente les spectres obtenus sur les sections reconstruites dans deux situations de photoblanchiment différentes. On remarque que lorsque le photoblanchiment est important, l'image reconstruite par soustraction des images brutes prises en illumination structurée est entachée d'un artefact de franges à la fréquence du motif de modulation. Une autre contrainte de ce type de microscopie pour notre système est le fait que les motifs projetés doivent avoir une période multiple de 6 pixels sur la matrice de micro-miroirs ce qui limite le choix de la fréquence spatiale de modulation. De plus, les motifs que l'on peut projeter avec la matrice de micro-miroirs ne sont pas des sinusoides ce qui conduit également à introduire des artefacts dans la reconstruction de l'image sectionnée optiquement. Ainsi, pour des raisons de dynamique et de reconstruction des images, la technique HiLo semble être plus adaptée à nos contraintes. Néanmoins, cette technique souffre également d'une limitation comme la microscopie développée par T. Wilson. En effet, malgré une standardisation des paramètres expérimentaux, tels que le temps d'exposition, la structure imagée, la puissance du laser, la fréquence spatiale du motif, des variabilités d'impression du motif et donc de reconstruction des coupes optiques demeurent d'un échantillon à l'autre. Cette variabilité du contraste du motif peut provenir par exemple de la préparation de l'échantillon. L'orientation précise de la tête de la drosophile lors du collage ainsi que la mise en place du gel d'agarose, permettant de restreindre les mouvements, conditionnent l'épaisseur de milieu {agarose+cerveau} traversée

pour l'imagerie de la zone d'intérêt. La différence de contraste peut également être due à une expression différentielle de la sonde fluorescente entre individus.

### 2.4.3 Le sectionnement optique de la microscopie HiLo en profondeur

La microscopie HiLo permet un sectionnement optique efficace tout en gardant une dynamique d'acquisition élevée, avec une réduction de la cadence d'imagerie qui se limite à un facteur deux en comparaison de la traditionnelle microscopie plein champ. Cette méthode permet d'améliorer grandement le contraste des images. Néanmoins, dans un échantillon épais, un grand nombre de photons ne contribuent pas au signal utile. Le rapport signal sur bruit de l'image finale peut alors s'écrire, pour une distribution poissonnienne, sous la forme  $(N_{\text{tranche}}/k)/\sqrt{N_{\text{tranche}}/k} = \sqrt{N_{\text{tranche}}/k}$  où  $N_{\text{tranche}}$  est le nombre de photons utiles émis par la section et  $k$  le rapport entre le nombre total de photons collectés et ceux de la tranche. Le rapport signal sur bruit est donc dégradé par les photons inutiles collectés, ce qui ne peut être compensé que par la collecte d'un nombre plus grand de photons. Si le nombre de photons collectés est suffisant, ce défaut n'est pas limitant. Il convient néanmoins de ne pas utiliser des puissances d'excitation trop importante afin de ne pas photoblanchir la région d'intérêt dans le plan de mise au point ce qui ferait dramatiquement chuter le rapport signal sur bruit de l'image finale. De plus, la dégradation du rapport signal sur bruit avec la profondeur est plus rapide en microscopie HiLo qu'en microscopie confocale. En effet en microscopie confocale, le rapport signal sur bruit,  $\sqrt{N_{\text{tranche}}}$ , dépend juste du nombre de photons dans la tranche. Lorsqu'on augmente la profondeur d'imagerie,  $N_{\text{tranche}}$  diminue dans ces deux techniques, mais dans le cas de la technique HiLo,  $k$  augmente car les couches supérieures émettent toujours et donc le signal total collecté ne varie pas. Pour améliorer l'imagerie tridimensionnelle d'échantillon épais, différentes techniques existent. La première méthode consiste à clarifier les tissus biologiques, c'est-à-dire à homogénéiser leur indice de réfraction par extraction des lipides par exemple [121, 122]. Néanmoins, cette solution n'est pas adaptée à nos études biologiques où c'est le caractère *in vivo* de l'expérience qui prime. On peut aussi augmenter le temps d'exposition des images ou augmenter la puissance d'excitation mais cela diminue d'une part la cadence d'imagerie dans le premier cas et d'autre part cela peut induire des phénomènes de photoblanchiment et/ou de phototoxicité indésirables.

La qualité de la reconstruction HiLo dépend du contraste du motif d'illumination. Lorsqu'on augmente la profondeur d'imagerie, une possibilité est de diminuer la fréquence spatiale de la grille comme cela a été démontré avec l'imagerie du lobe  $\beta$  à 80  $\mu\text{m}$  de profondeur (figure 2.39). Néanmoins, la diminution de la fréquence spatiale du motif d'illumination revient, en microscopie confocale, à augmenter le diamètre du trou de filtrage et donc à dégrader la qualité de la coupe optique. Pour pallier ce problème, une approche d'excitation non linéaire peut être envisagée. En effet, comme expliqué dans la section 2.1.3.3, l'utilisation d'un rayonnement de plus grande longueur d'onde pour l'excitation permet d'en limiter son absorption et sa diffusion par les tissus. L'idée est alors de combiner une technique plein champ HiLo avec une excitation biphotonique. Il y a déjà des réalisations expérimentales de

## Chapitre 2. Microscopie de fluorescence à illumination structurée HiLo pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile

---

ce principe en microscopie à illumination structurée de façon générale [123, 124, 125, 126] et aussi en microscopie HiLo [127]. Les principaux gains cités sont une amélioration du contraste, du sectionnement optique ainsi que de la profondeur d'imagerie accessible. Néanmoins, cette technique combinant microscopie à illumination structurée et excitation biphotonique présente une limitation majeure concernant la taille du champ de vue qu'il est possible d'imager. En effet, l'augmentation de la surface éclairée réduit considérablement la densité de puissance nécessaire à l'absorption biphotonique (à moins de disposer d'un laser impulsionnel de durée d'impulsion d'environ 100 fs de forte puissance).

Afin d'améliorer les performances de notre microscope principalement en profondeur, tout en conservant des puissances d'excitation raisonnables, nous avons choisi d'implémenter une boucle d'optique adaptative permettant de corriger les aberrations optiques. Ces travaux font l'objet du Chapitre 3.

### 2.5 Conclusion

Ce chapitre a permis de présenter la microscopie à illumination structurée qui, utilisant la propriété de défocalisation rapide des hautes fréquences spatiales, introduit une "porteuse optique" afin d'extraire l'information utile du plan de mise au point. Nous avons tiré parti des développements technologiques des systèmes microélectromécaniques, comme la matrice de micro-miroirs, dans le but de développer un microscope optique rapide dont la capacité de sectionnement optique repose sur l'illumination structurée. La microscopie confocale demeure avec la microscopie biphotonique les techniques standard d'imagerie du cerveau de la drosophile dans de nombreuses équipes de recherche. Le principal avantage de notre approche est la prise d'images plein champ ne nécessitant donc pas de balayage de l'échantillon point à point. Cela permet ainsi de diminuer l'excitation laser car chaque point du champ de vue n'est pas illuminé que pendant un laps de temps très court (typiquement de l'ordre de la microseconde en microscopie confocale), mais durant tout le temps de pause de l'image. La résolution spatiale de l'imagerie à illumination structurée de type HiLo reste toutefois comparable à celle de la microscopie confocale. La résolution et la rapidité du microscope développé ouvrent la voie pour des analyses globales de réseaux neuronaux en activité. Néanmoins, toute la puissance de la microscopie à illumination structurée repose sur l'impression du motif d'illumination dans l'échantillon. Plus on veut imager des structures profondes dans le cerveau, plus le contraste du motif d'illumination est dégradé car la diffusion et les aberrations optiques introduites par les tissus atténuent la transmission des hautes fréquences spatiales. L'accès aux aires cérébrales en profondeur dans le cerveau peut se faire au détriment de la qualité de la coupe optique en élargissant le motif d'illumination. Une autre solution est d'implanter une boucle d'optique adaptative sur le microscope afin de restaurer ses capacités de sectionnement optique, même en profondeur, dans le cerveau de la drosophile.



# 3

## Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

### Sommaire

---

3.1	L'optique adaptative en microscopie optique de fluorescence . . . . .	86
3.1.1	Introduction . . . . .	86
3.1.2	Les aberrations optiques . . . . .	86
3.1.2.1	La déformation du front d'onde . . . . .	86
3.1.2.2	Origines des aberrations optiques . . . . .	87
3.1.2.3	L'effet des aberrations optiques . . . . .	89
3.1.3	La correction des aberrations par l'optique adaptative . . . . .	89
3.1.3.1	L'analyseur de front d'onde . . . . .	89
3.1.3.2	Le correcteur de front d'onde, élément optique actif . . . . .	91
3.1.3.3	L'optique adaptative avec mesure de front d'onde . . . . .	92
3.1.3.4	L'optique adaptative sans mesure de front d'onde . . . . .	94
3.2	Matériel et méthodes : L'algorithme d'optimisation et le montage optique . . .	95
3.2.1	Le procédé d'optimisation des images . . . . .	95
3.2.1.1	L'algorithme d'optimisation $3N$ . . . . .	95
3.2.1.2	Le choix du facteur de mérite . . . . .	95
3.2.2	La base de décomposition des aberrations . . . . .	98
3.2.3	Le montage optique . . . . .	98
3.3	Résultats : Caractérisation et performances du système . . . . .	100
3.3.1	Évaluation des aberrations différentielles entre voies d'excitation et d'émission . . . . .	100
3.3.2	Évaluation de l'extension spatiale latérale de la correction . . . . .	103

## Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

---

3.3.3	Évaluation de l'extension spatiale axiale de la correction dans le cerveau de la drosophile . . . . .	106
3.3.4	Stabilité temporelle de la correction pour l'imagerie <i>in vivo</i> . . . . .	108
3.3.5	Dépendance de la fréquence spatiale du motif d'excitation . . . . .	109
3.4	Résultats : Imagerie HiLo <i>in vivo</i> en profondeur dans le cerveau de la drosophile avec correction des aberrations optiques . . . . .	<b>110</b>
3.4.1	Amélioration du contraste de la grille . . . . .	110
3.4.2	Reconstruction HiLo . . . . .	111
3.5	Discussion et perspectives . . . . .	<b>113</b>
3.5.1	Une “étoile guide” plein champ intrinsèquement liée à la microscopie à illumination structurée . . . . .	113
3.5.2	La base de projection des modes d'aberrations et les modes sélectionnés pour l'optimisation du front d'onde . . . . .	114
3.5.3	Zone isoplanétique de correction des aberrations . . . . .	117
3.5.4	Perspectives : Correction avec “étoile guide” générée par excitation bi-photonique et imagerie par microscopie HiLo à un photon . . . . .	118
3.6	Conclusion . . . . .	<b>119</b>

---

Le Chapitre 2 a montré que la microscopie à illumination structurée de type HiLo permet de s'affranchir des photons provenant des régions d'un échantillon épais situées hors du plan de mise au point. Cette caractéristique est particulièrement importante dans le cas de l'imagerie du cerveau de la drosophile. En effet, il s'agit d'un échantillon biologique, considéré comme optiquement épais, puisqu'il est d'une épaisseur typique d'environ  $100 \mu\text{m}$  pour ce qui concerne la zone d'intérêt de notre étude, les corps pédonculés. Le rapport signal sur bruit des images obtenues grâce à la microscopie à illumination structurée dépend grandement du contraste du motif projeté sur l'échantillon. La fréquence du motif utilisé influe sur l'épaisseur de coupe et le choix de cette fréquence est largement dicté par sa projection correcte dans l'échantillon. Ainsi, l'imagerie en surface du cerveau par microscopie à illumination structurée pourra être réalisée, sans difficulté, avec un motif d'illumination de typiquement 2 à  $3 \mu\text{m}$  de période, ce qui fera l'objet du Chapitre 5. Si l'on veut imager des structures plus profondes dans le cerveau, en utilisant cette même fréquence de grille, le contraste du motif chute très rapidement avec la profondeur du fait des aberrations optiques. La figure 3.1 présente la quantification du contraste de la grille avec la profondeur réalisée au niveau de la partie verticale de la branche axonale  $\alpha/\beta$ . Cette branche se prête particulièrement bien à cette quantification du fait de son orientation géométrique alignée avec l'axe optique du microscope. Dès  $13 \mu\text{m}$  de profondeur, le contraste de la grille est divisé par deux par rapport à sa valeur à la surface du cerveau (figure 3.1F). Pour conserver un contraste du motif et un niveau de signal sur bruit acceptables avec la profondeur, il est nécessaire de diminuer la fréquence spatiale du motif. Cette diminution a néanmoins pour conséquence une dégradation de la coupe optique obtenue par la microscopie à illumination structurée. Afin de réaliser l'imagerie tridimensionnelle *in vivo* du cerveau de la drosophile, en conservant une bonne qualité de section optique sur l'ensemble de l'épaisseur imagée, les aberrations optiques qui conduisent à la déformation du front d'onde doivent être corrigées. Ainsi, ce chapitre présente la mise en œuvre d'un système d'optique adaptative sur le dispositif

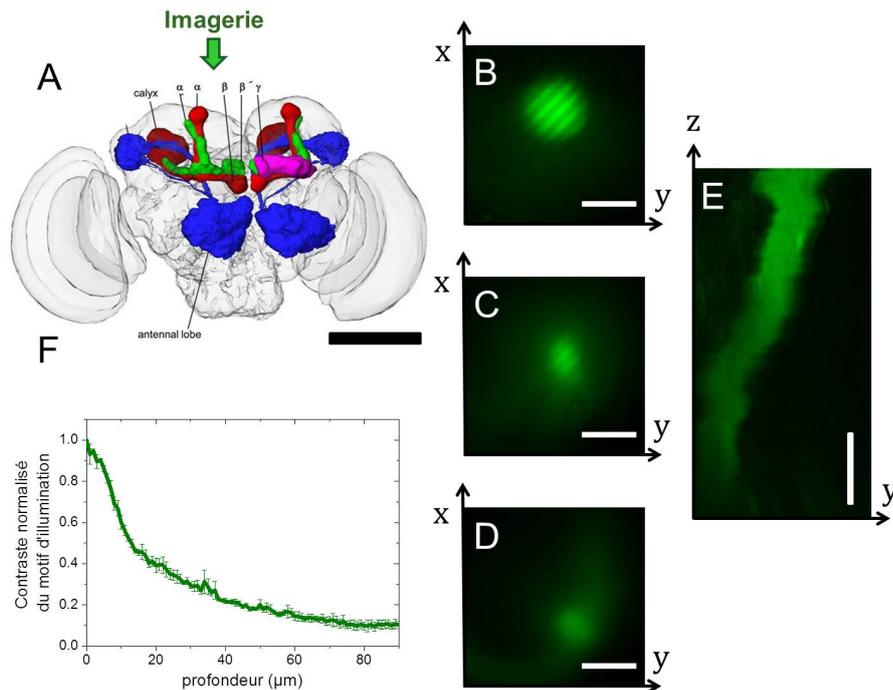


FIGURE 3.1 – Imagerie HiLo, sans correction des aberrations optiques, du lobe  $\alpha$  en profondeur dans le cerveau de la drosophile. (A) Schématisation du cerveau de la drosophile. La zone imagée est la partie verticale de la branche  $\alpha/\beta$  (en vert). Barre d'échelle :  $100 \mu\text{m}$ . La figure est extraite de [128]. (B) Image avec une illumination structurée à  $5 \mu\text{m}$  de profondeur. (C) Image avec une illumination structurée à  $40 \mu\text{m}$  de profondeur. (D) Image avec une illumination structurée à  $80 \mu\text{m}$  de profondeur. Pour (B), (C) et (D), la période de la grille utilisée est  $4 \mu\text{m}$  dans le plan de l'échantillon et la barre d'échelle correspond à  $20 \mu\text{m}$ . (E) Reconstruction HiLo en profondeur. Le pas axial est  $1 \mu\text{m}$ . Barre d'échelle :  $20 \mu\text{m}$ . (F). Contraste du motif d'illumination pour une fréquence spatiale typique de  $4 \mu\text{m}$  dans l'échantillon calculé en utilisant la formule 2.21 du Chapitre 2. Une normalisation a été appliquée par rapport à la valeur du contraste de la grille en surface du cerveau.

de microscopie à illumination structurée afin de restaurer les performances de sectionnement optique de ce microscope en profondeur dans le cerveau de la drosophile. Dans la première section, on introduit le concept d'optique adaptative ainsi que les technologies communément associées à la correction des aberrations optiques. Notre dispositif optique ainsi que l'algorithme d'optimisation de la qualité des images sont décrits dans les sections suivantes. Dans la dernière section, nous montrons à titre d'exemple sa capacité à résoudre efficacement notre problème à  $40 \mu\text{m}$  de profondeur *in vivo* dans le cerveau de la drosophile. Ces travaux ont donné lieu à l'écriture d'une publication qui est actuellement en phase de soumission (annexe D).

## 3.1 L'optique adaptative en microscopie optique de fluorescence

### 3.1.1 Introduction

La microscopie optique de fluorescence est actuellement très utilisée pour la compréhension du vivant notamment grâce au développement des sondes fluorescentes encodées génétiquement qui permettent des études spécifiques morphologiques ou fonctionnelles. Néanmoins, la résolution des microscopes optiques est souvent limitée par les propriétés optiques de l'échantillon observé qui dégrade la qualité des images obtenues. Cette limitation concerne plus particulièrement l'imagerie en profondeur. En effet, la lumière doit alors traverser une grande épaisseur de tissus biologiques qui sont en général diffusants et aberrants optiquement du fait principalement de variations et/ou de sauts d'indice de réfraction. Pour pallier ce problème, il est nécessaire d'implanter sur les microscopes optiques un système d'optique adaptative. L'optique adaptative a été d'abord développée pour des applications dans le domaine de l'astronomie [129, 130, 131] afin de corriger les aberrations optiques des images acquises avec les télescopes. En effet quand on image une étoile, la lumière qu'elle émet, avant de parvenir jusqu'au télescope, va rencontrer des turbulences atmosphériques qui vont dégrader la qualité de l'image obtenue. L'optique adaptative a aussi trouvé un domaine d'application dans l'imagerie ophtalmologique afin de compenser les distorsions du front d'onde introduites par la structure de l'œil et ainsi imager la rétine avec une résolution spatiale suffisante pour en distinguer les photorécepteurs à sa surface par exemple.

### 3.1.2 Les aberrations optiques

#### 3.1.2.1 La déformation du front d'onde

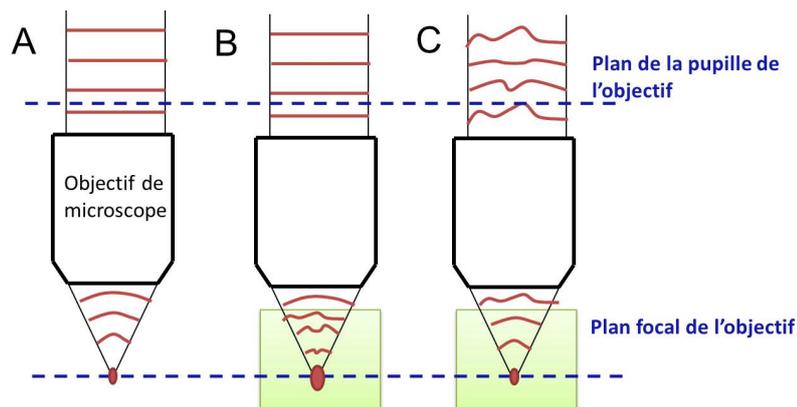


FIGURE 3.2 – Effet des aberrations optiques sur la forme du front d'onde. (A) Cas idéal sans aberration optique. (B) Focalisation à travers un échantillon optiquement complexe et introduction d'aberrations qui conduisent à des variations de phase du front d'onde. (C) Compensation des aberrations par introduction, au niveau de la pupille, de la phase conjuguée. En vert est représenté un échantillon épais. Les fronts d'onde sont tracés en rouge.

### Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

---

Un objectif de microscope idéal, ne présentant aucune aberration optique, transforme une onde plane incidente en onde sphérique (diaphragmée par l'ouverture de l'objectif) (figure 3.2A). L'extension spatiale de la tache de focalisation est alors limitée par la diffraction. Lorsque la lumière traverse un échantillon avant d'atteindre son point de focalisation, les aberrations induites par celui-ci conduisent à la déformation du front d'onde qui n'a plus sa forme sphérique idéale (figure 3.2B). Ces aberrations optiques correspondent à des variations de phase au niveau de la pupille de l'objectif de microscope. Ainsi, en introduisant une phase égale mais opposée en signe au niveau de la pupille de l'objectif, les aberrations optiques, qui induisent la déformation des fronts d'onde, peuvent être compensées (figure 3.2C). L'optique adaptative est à la base de cette compensation en utilisant des éléments optiques actifs tels que des miroirs déformables dont le fonctionnement sera décrit ultérieurement. La phase du front d'onde peut être représentée par une surface tridimensionnelle. Dans le cas d'un système optique, où la pupille est de forme circulaire, une représentation appropriée des fronts d'onde aberrants est la base des polynômes de Zernike [132]. Les polynômes de Zernike d'ordre les plus bas correspondent à des aberrations couramment rencontrées dans les microscopes optiques comme l'astigmatisme, l'aberration sphérique, le trefoil ou la coma (figure 3.3). Mathématiquement, les polynômes de Zernike s'expriment sous la forme générale :

$$Z_n^m(\rho, \varphi) = R_n^m \cos(m\varphi) \text{ et } Z_n^{-m}(\rho, \varphi) = R_n^m \sin(m\varphi), \quad (3.1)$$

où  $m, n \in \mathbb{R}^*, n \geq m$ ,  $\rho$  est la distance radiale normalisée comprise entre 0 et 1 et  $\varphi$  correspond à l'angle azimuthal.  $R_n^m$  sont les polynômes radiaux définis ainsi :

$$R_n^m(\rho) = \sum_{k=0}^{(n-m)/2} (-1)^k \binom{n-k}{k} \binom{n-2k}{\frac{n-m}{2}-k} \rho^{n-2k}, \quad (3.2)$$

où la combinaison est définie mathématiquement comme suit :

$$\binom{b}{a} = \frac{b!}{a! (b-a)!}. \quad (3.3)$$

Les expressions des polynômes de bas ordre, les plus couramment utilisés, sont données dans le tableau 3.1.

#### 3.1.2.2 Origines des aberrations optiques

Les sources d'aberrations optiques sont nombreuses mais peuvent néanmoins être subdivisées en deux grandes catégories. Des aberrations optiques peuvent être introduites par le dispositif optique de microscopie lui-même indépendamment de la nature de l'échantillon imagé [133]. C'est le cas des lentilles dont l'axe n'est pas parfaitement aligné avec l'axe optique ou d'éléments optiques non adaptés à la longueur d'onde utilisée [112]. Les aberrations optiques introduites par le système de microscopie sont pour la plupart des aberrations statiques et peuvent donc être corrigées en amont de l'imagerie. En ce qui concerne l'échantillon, l'aberration optique la plus fréquente est due à une différence d'indice de réfraction entre l'échantillon et le milieu d'immersion de l'objectif de microscope. Dans notre cas, cette différence est amoindrie par l'utilisation d'un objectif à immersion à eau pour l'imagerie du cerveau de la drosophile.

### Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

indice $n$	indice $m$	$Z_n^m(\rho, \varphi)$	Aberration associée
0	1	1	Piston
1	1	$2\rho \cos(\varphi)$	Basculement X
1	-1	$2\rho \sin(\varphi)$	Basculement Y
2	0	$\sqrt{3}(2\rho^2 - 1)$	Défocalisation
2	-2	$\sqrt{6}\rho^2 \sin(2\varphi)$	Astigmatisme du 1 <sup>er</sup> ordre à 45°
2	2	$\sqrt{6}\rho^2 \cos(2\varphi)$	Astigmatisme du 1 <sup>er</sup> ordre à 0°
3	-1	$\sqrt{8}(3\rho^3 - 2\rho) \sin(\varphi)$	Coma Y
3	1	$\sqrt{8}(3\rho^3 - 2\rho) \cos(\varphi)$	Coma X
3	-3	$\sqrt{8}\rho^3 \sin(3\varphi)$	Trefoil 30°
3	3	$\sqrt{8}\rho^3 \cos(3\varphi)$	Trefoil 0°
4	0	$\sqrt{5}(6\rho^4 - 6\rho^2 + 1)$	Aberration sphérique

Tableau 3.1 – Expression analytique des polynômes de Zernike les plus couramment employés en optique adaptative et nom de l'aberration optique associée.

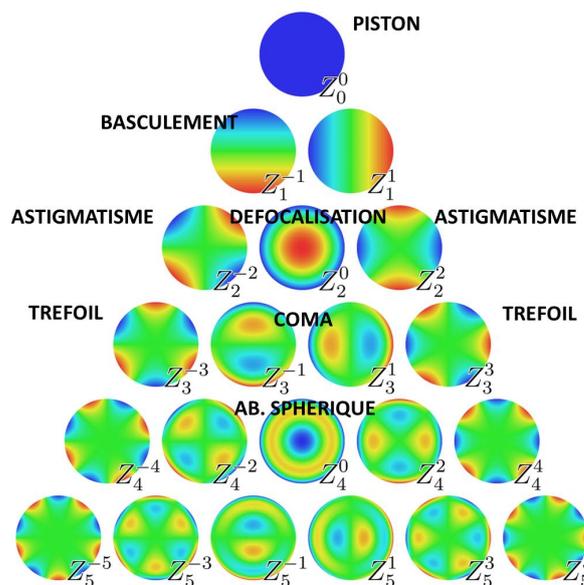


FIGURE 3.3 – Représentation des premiers polynômes de Zernike. L'aberration associée à certains de ces polynômes est indiquée : piston, basculement, défocalisation, astigmatisme, trefoil, coma, aberration sphérique.

Néanmoins, il ne faut pas négliger cet effet car la lumière, avant d'atteindre le cerveau de la drosophile, traverse deux milieux : l'eau (plus précisément le liquide physiologique) qui constitue le liquide d'immersion puis l'agarose placée sur le cerveau de la drosophile pour en réduire les mouvements. L'indice de réfraction de l'agarose (de concentration massique typique de 2%) est néanmoins très proche de celui de l'eau. L'aberration principale engendrée est alors l'aberration sphérique qui entraîne un décalage entre le foyer paraxial et le meilleur foyer dépendant de la profondeur de mise au point. Cet effet a été largement étudié dans le cas des micro-

## Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

---

scopes optiques à balayage tels que la microscopie confocale ou la microscopie biphotonique [134, 135, 136, 137, 138]. La structure inhomogène des milieux biologiques peut également être à l'origine d'aberrations plus complexes dues à des variations locales de l'indice de réfraction. Ces aberrations doivent être corrigées pour obtenir une imagerie optique de qualité non seulement superficiellement mais également en profondeur dans l'échantillon étudié.

### 3.1.2.3 L'effet des aberrations optiques

Les aberrations optiques conduisent à l'étalement de la réponse impulsionnelle (PSF) latéralement mais également axialement, ce qui entraîne une dégradation de la résolution. En effet, la PSF s'éloigne alors de la limite de diffraction, ce qui cause une augmentation de la profondeur de champ. La microscopie biphotonique est particulièrement affectée par l'étalement de la PSF et donc la diminution de la densité d'énergie lumineuse au point focal, car l'absorption varie comme le carré de l'intensité lumineuse contrairement à la microscopie confocale traditionnelle [91, 139]. Néanmoins, la microscopie confocale est aussi très sensible aux aberrations optiques qui affectent également la voie d'excitation. En effet, l'optimum de performance d'un microscope confocal est atteint lorsque les voies d'illumination et d'émission sont limitées par diffraction. L'augmentation du volume focal diminue localement la puissance d'excitation lumineuse. Afin de restaurer un niveau d'intensité suffisant, il est possible d'augmenter la puissance d'illumination, ce qui n'est néanmoins pas adapté à l'imagerie du vivant. En microscopie à illumination structurée, la qualité des images est également impactée par la présence d'aberrations optiques qui dégradent le contraste de la grille. Pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile, il convient donc de développer un système d'optique adaptative pour corriger les aberrations optiques qui limitent les performances de l'imagerie HiLo en profondeur.

### 3.1.3 La correction des aberrations par l'optique adaptative

Les deux éléments de base d'un système d'optique adaptative sont :

- un analyseur de front d'onde qui permet de mesurer la forme du front d'onde perturbé par la présence d'aberrations optiques,
- un correcteur de front d'onde qui tente activement de restaurer une forme de front d'onde idéale.

#### 3.1.3.1 L'analyseur de front d'onde

Il existe différents types de mesureur de front d'onde mais l'analyseur le plus couramment utilisé, et celui qui sera également employé pour les expériences présentées dans ce chapitre, est l'analyseur de Shack-Hartmann [140]. Il est constitué d'une matrice de micro-lentilles identiques et d'un détecteur de type CCD placé dans le plan focal de ces micro-lentilles. La matrice de micro-lentilles est généralement (mais ce n'est pas une nécessité) conjuguée de la pupille de sortie de l'objectif de microscope. Chaque micro-lentille intercepte une subdivision du faisceau provenant de la pupille de sortie de l'objectif, appelée sous-pupille, et la focalise sur le capteur. Si le front d'onde incident est plan et perpendiculaire à l'axe de l'analyseur, alors les images données par chaque sous-pupille seront situées sur les foyers images de chacune des micro-lentilles, conduisant à un ensemble de taches formant un motif de grille régulier sur le capteur.

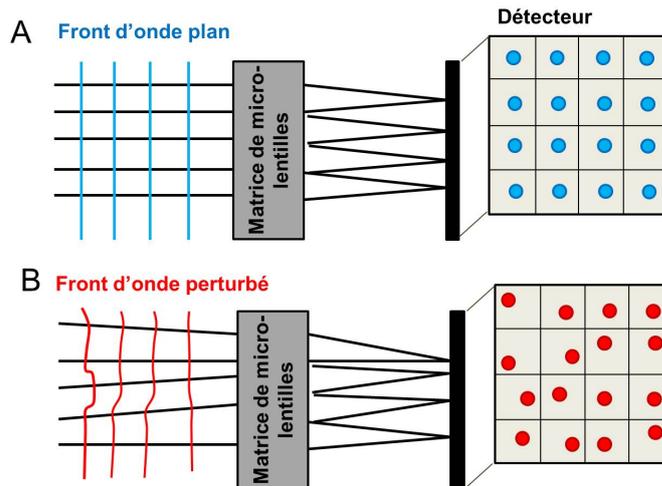


FIGURE 3.4 – Principe de fonctionnement de l'analyseur de front d'onde de type Shack-Hartmann. (A) Dans le cas où le front d'onde incident est plan, les images par les différentes micro-lentilles forment une grille régulière au niveau du détecteur. (B) Dans le cas où le front d'onde incident est perturbé, les images par les différentes micro-lentilles ne seront pas aux foyers image de celles-ci.

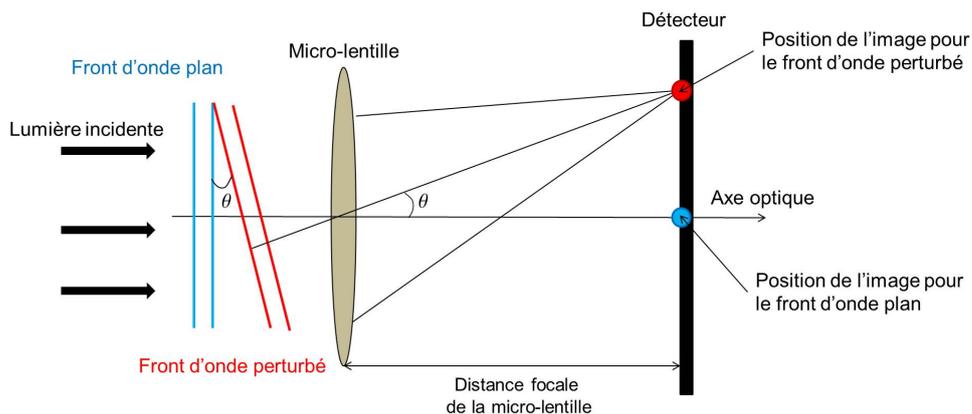


FIGURE 3.5 – Lien, à l'échelle d'une unique micro-lentille, entre l'écart du front d'onde à mesurer par rapport au front d'onde plan et la position de l'image sur le détecteur pour un analyseur de front d'onde de type Shack-Hartmann.

Si le front d'onde est perturbé, alors les taches focales ne sont plus au niveau des foyers images de chaque micro-lentille mais sont déplacées par rapport à leur position de référence définie en l'absence de toute aberration optique (figure 3.4). Comme montré sur la figure 3.5, l'angle entre la position actuelle de la tache de focalisation et l'axe optique est le même que celui entre le front d'onde plan idéal et le front d'onde perturbé. La mesure du déplacement des barycentres des points de focalisation, donnés par chaque micro-lentille, permet de remonter aux gradients de la phase selon les deux directions latérales dans chaque sous-pupille. La mesure du gradient de la phase se fait localement en faisant l'approximation que le front d'onde global peut être approché par un ensemble de fronts d'onde plan basculés par rapport au front d'onde plan

### Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

idéal. Le front d'onde est alors reconstruit à partir de l'ensemble des valeurs de pente de la phase à une constante d'intégration près. La résolution latérale de ce mesureur de front d'onde est dictée par la taille des sous-pupilles. Le modèle d'analyseur de front d'onde de type Shack-Hartmann, qui sera utilisé dans notre étude, est HASO 3 first commercialisé par la société Imagine Optic. Le système est constitué d'une matrice mesurant  $4.9 \times 6.1 \text{ mm}^2$  composée de 32 par 40 micro-lentilles.

#### 3.1.3.2 Le correcteur de front d'onde, élément optique actif

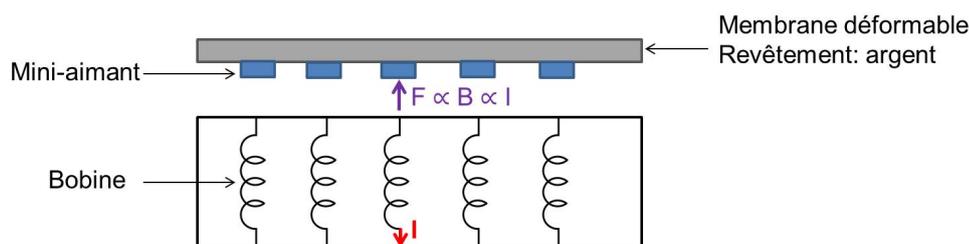


FIGURE 3.6 – Schématisation du miroir déformable magnétique. Seuls cinq actionneurs sont représentés.

Afin de précompenser les aberrations introduites à la fois par le dispositif optique et par l'échantillon, il est nécessaire de corriger le front d'onde en introduisant un déphasage au niveau de la pupille de l'objectif de microscope. Ce déphasage peut être créé par exemple en changeant localement l'indice de réfraction grâce à des matrices de cristaux liquides [141]. L'inconvénient de ce type de correcteur est qu'il a une dynamique temporelle insuffisante pour l'imagerie *in vivo*. Une seconde possibilité pour moduler la phase est de changer le chemin géométrique parcouru par la lumière, en travaillant non plus en transmission mais en réflexion, à l'aide de miroirs déformables. Les miroirs déformables ont tout d'abord été mis en œuvre sur les microscopes à balayage confocaux ou biphotoniques où il se sont révélés très efficaces [142, 143, 144, 145]. Il existe de nombreuses variétés de miroirs déformables et il est parfois difficile de sélectionner le modèle approprié, en termes de rapidité, de qualité optique, de linéarité, de stabilité ou de dynamique de correction lorsque l'on n'a pas de connaissance *a priori* des aberrations optiques que l'on doit compenser. Les miroirs déformables varient entre eux notamment par leur mode d'actionnement tels que l'utilisation d'effets piezo-électrique, électrostatique, électromagnétique ou thermique. Ils consistent tous en la déformation, par des actionneurs, d'une plaque de verre recouverte d'un revêtement réfléchissant. Les actionneurs, qui furent au début les plus couramment employés, étaient de nature piezo-électrique, se déformant proportionnellement au champ électrique appliqué. Malgré leur grande qualité optique, les miroirs déformables, dont le fonctionnement est basé sur l'utilisation d'actionneurs piezo-électriques, souffrent d'un phénomène d'hystérésis non négligeable (2% à 20% suivant les matériaux utilisés) ainsi que d'une grande distance entre les actionneurs. Un autre type d'actionnement est l'effet électrostatique. L'amplitude de la déformation pouvant être atteinte avec cette catégorie de miroirs déformables est toutefois relativement limitée (typiquement inférieure à  $6 \mu\text{m}$ ). Le modèle de miroir déformable qui sera utilisé dans nos expériences est Mirao 52 E (Imagine Optic). Il fonctionne

## Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

---

par un principe d'actionnement électrodynamique. La figure 3.6 schématise la structure de ce miroir déformable magnétique. Des petits aimants sont accrochés sur la membrane flexible. Une tension appliquée aux différentes bobines va créer un champ magnétique qui va pousser ou attirer l'aimant situé au dessus suivant le signe de la tension appliquée. La force exercée alors par chacun des actuateurs sur la membrane est proportionnelle au champ magnétique  $B$  créé au niveau des bobines et donc au courant  $I$  circulant dans celles-ci car  $B$  s'exprime sous la forme :

$$B = \frac{\mu_0 N}{L} I, \quad (3.4)$$

où  $\mu_0$ ,  $N$  et  $I$  correspondent respectivement à la perméabilité magnétique du vide (constante de valeur  $4\pi 10^{-7}$  S.I.), au nombre de spires des bobines et à la longueur des bobines exprimée en mètres. Le modèle Mirao 52 E, de diamètre 15 mm, qui possède 52 actuateurs magnétiques, autorise une déformation de la membrane jusque  $\pm 50 \mu\text{m}$  et permet une correction des modes d'aberrations jusqu'au sixième ordre des polynômes de Zernike [146, 147]. La linéarité de l'actionnement dépasse 95% et l'hystérésis est inférieure à 1%. Le coefficient de réflexion de la membrane, recouverte d'un revêtement d'argent, est supérieure à 95% dans le visible.

Il existe deux grandes stratégies en optique adaptative pour corriger les aberrations optiques :

- soit la correction se fait, en boucle fermée, à partir d'une mesure de front d'onde provenant d'une "étoile guide" dans l'échantillon,
- soit la correction est atteinte en optimisant un facteur de mérite qui permet de quantifier la qualité de l'image obtenue.

### 3.1.3.3 L'optique adaptative avec mesure de front d'onde

Les méthodes basées sur la mesure de front d'onde nécessitent la présence dans l'échantillon d'un point source de référence. Ce point source, traditionnellement appelé "étoile guide" (nom emprunté à l'astrophysique) permet de produire un front d'onde de référence. Par exemple en astronomie, des étoiles lointaines mais suffisamment brillantes peuvent être utilisées comme point de référence car le front d'onde provenant d'une source à l'infini est plan en absence d'aberration sur le trajet de la lumière. Néanmoins, ces étoiles naturelles brillantes sont en nombre insuffisant et ne permettent alors d'imager qu'une faible portion du ciel. Pour augmenter la couverture du ciel, une solution est d'utiliser une étoile artificielle générée par un laser, émettant à 589 nm, qui excite "ponctuellement" la fluorescence des atomes de sodium dans une couche d'atmosphère située à 100 km d'altitude. De nombreuses études s'intéressent à la formation de ce type d'"étoile guide" pour qu'elle puisse réellement être utilisée comme front d'onde de référence dans la boucle d'optique adaptative, notamment le type de laser utilisé pour l'excitation ainsi que sa qualité optique [148] ou les variations spatio-temporelles du nuage d'atomes de sodium [149, 150]. La correction des aberrations optiques par mesure de front d'onde fonctionne en boucle fermée avec un analyseur de front d'onde (par exemple de type Shack-Hartmann) et un élément corrigeant le front d'onde comme un miroir déformable.

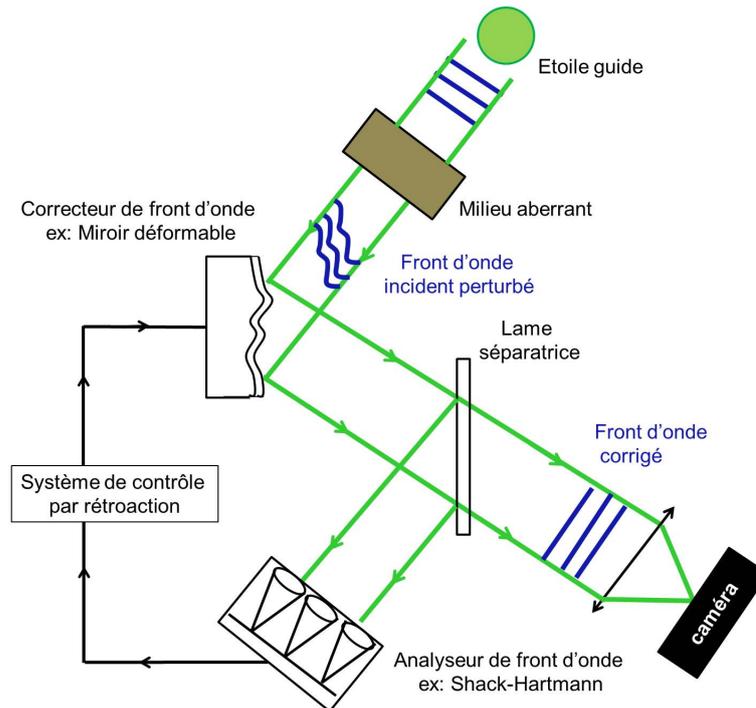


FIGURE 3.7 – Schématisation de l'optique adaptative en boucle fermée avec mesure du front d'onde.

Une représentation simplifiée du fonctionnement de la boucle d'optique adaptative est donnée sur la figure 3.7. Le front d'onde incident est mesuré avec l'analyseur de front d'onde, une lame séparatrice permettant de prélever une partie du faisceau. Ce front d'onde est comparé à un front d'onde de référence afin d'en tirer un signal d'erreur. Les déformations, qui sont alors appliquées au miroir déformable, permettent de se rapprocher du front d'onde optimal. En astronomie, l'étendue angulaire de la portion de voûte céleste débarrassée des aberrations est très réduite, de l'ordre de quelques secondes d'arc (une seconde d'arc correspond à  $0.000277^\circ$ ).

L'optique adaptative, par mesure d'un front d'onde de référence, est également applicable pour corriger les aberrations en microscopie optique. Néanmoins, la situation est plus compliquée car il est rare de disposer d'un point source de référence proche de la zone d'intérêt dans la structure tridimensionnelle d'un échantillon biologique. En absence d'émetteur ponctuel unique, l'analyseur de front d'onde collecte une multitude de fronts d'onde provenant de différents émetteurs présents dans l'échantillon. En se basant sur l'utilisation d'"étoiles guides", l'optique adaptative en boucle fermée a produit des résultats encourageants, pour les microscopies à balayage comme la microscopie confocale [151] ou la microscopie biphotonique, en conduisant ainsi à une amélioration de la résolution axiale et du contraste des images corrigées. Les "étoiles guides" sont par exemple de billes fluorescentes implantées artificiellement dans l'échantillon [151, 152] ou d'un marquage fluorescent dans une zone très spécifique comme un neurone unique [153]. L'"étoile guide" peut aussi, comme en astronomie, être créée par excitation laser biphotonique soit des rapporteurs fluorescents [154], soit des fluorophores endogènes [155] comme la molécule de NADH, dans le proche infrarouge.

## Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

---

Le principe de l'excitation biphotonique est détaillé dans la section 2.1.3.3 du Chapitre 2. L'excitation biphotonique de l'autofluorescence est notamment adaptée lorsque la fluorescence des sondes fluorescentes est trop faible pour permettre une mesure correcte du front d'onde et peut présenter l'avantage d'être spectralement différente des fluorophores traditionnellement utilisés comme la molécule de GFP. Le concept d'“étoile guide” s'applique également à l'optique adaptative pour la microscopie plein champ. Des améliorations à l'imagerie plein champ ont ainsi pu être apportées en utilisant des billes fluorescentes spectralement différentes du marquage fluorescent d'intérêt, réparties spatialement dans le champ imagé [156, 157, 158]. Les billes fluorescentes sont largement utilisées en biologie et peuvent être insérées dans l'échantillon de différentes manières telles que l'injection sous pression ou la diffusion. La non-invasivité de l'insertion de billes fluorescentes pour l'imagerie des embryons de drosophiles a été prouvée [159]. Néanmoins, l'impact de l'injection de billes pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile n'est pas connu. Nous avons donc opté en première approche pour une correction d'aberrations sans mesure de front d'onde d'un objet de référence mais sur une optimisation d'un critère permettant de quantifier la qualité de l'image. Cette approche est certainement plus lente car elle nécessite la prise d'un grand nombre d'images, au contraire de la technique avec l'analyseur de surface d'onde qui ne demande que la mesure d'un unique front d'onde, mais elle n'apporte aucune contrainte supplémentaire à la préparation de l'échantillon vivant.

### 3.1.3.4 L'optique adaptative sans mesure de front d'onde

Comme les aberrations optiques affectent la qualité des images de microscopie, il est possible d'extraire des informations sur ces aberrations à partir de ces données. Cette stratégie de correction d'aberration ne requiert qu'un changement mineur dans la géométrie du microscope avec l'insertion d'un élément optique de correction comme un miroir déformable. Cette approche repose sur le jugement de la qualité d'une image à l'aide d'une grandeur mathématique scalaire dont la valeur dépend du contenu de l'image. Le critère le plus couramment employé en microscopie à balayage est la maximisation de l'intensité totale de fluorescence de l'image. Il s'applique en microscopie confocale traditionnelle, en microscopie biphotonique [139, 143, 144, 160] ou en microscopie non linéaire telle que la génération de seconde harmonique [161] ou de troisième harmonique [162]. Pour l'optimisation, différents types d'algorithmes existent dont les algorithmes génétiques [144]. Néanmoins, ce type d'algorithme requiert la prise d'un grand nombre d'images. Afin de réduire ce nombre d'images, il peut être intéressant de représenter les aberrations optiques dans une base mathématique discrète de fonctions comme les polynômes de Zernike présentés dans la section 3.1.2.1. Cette approche a été fructueuse en microscopie confocale [142] et en microscopie à illumination structurée [163]. Tout le défi de l'optimisation est de définir le paramètre adéquat pour juger la qualité de l'image et le procédé algorithmique adapté à la situation en terme de rapidité de correction (vitesse de convergence, nombre d'itérations) ou de stabilité. Dans notre cas, le dispositif d'optique adaptative doit être intégré à l'imagerie plein champ HiLo et aux contraintes de l'échantillon biologique en terme de photoblanchiment des rapporteurs fluorescents et de dynamique de correction.

## 3.2 Matériel et méthodes : L'algorithme d'optimisation et le montage optique

### 3.2.1 Le procédé d'optimisation des images

#### 3.2.1.1 L'algorithme d'optimisation $3N$

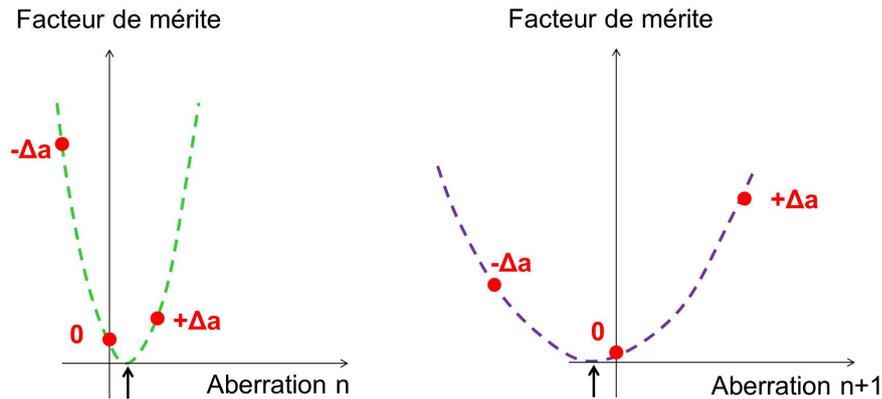


FIGURE 3.8 – Principe de fonctionnement de l'algorithme d'optimisation séquentielle  $3N$ . Pour chaque aberration de la base choisie, trois mesures du facteur de mérite sont effectuées pour des quantités d'aberrations égales à :  $0$ ,  $+\Delta a$  et  $-\Delta a$ . Un ajustement parabolique est ensuite utilisé pour déterminer la valeur d'aberration correspondant à la minimisation du facteur de mérite (indiquée par une flèche). Seules deux aberrations sont représentées ici.

Le processus d'optimisation consiste à minimiser un facteur de mérite calculé à partir des images de fluorescence enregistrées. Les différentes aberrations optiques, se décomposant sur la traditionnelle base des polynômes de Zernike, sont séquentiellement compensées. Le principe de l'algorithme d'optimisation utilisé, appelé  $3N$  où  $N$  correspond aux nombres de modes d'aberration à corriger, est décrit à la figure 3.8. A partir d'une forme initiale du miroir déformable, par déformation de celui-ci, une quantité précise de l'aberration  $n$  est ajoutée ( $+\Delta a$ ) puis soustraite ( $-\Delta a$ ). Ainsi pour l'aberration  $n$ , trois valeurs du facteur de mérite sont déterminées. Un ajustement parabolique permet ensuite de déterminer la forme du miroir déformable appropriée pour corriger cette aberration. L'aberration suivante  $n + 1$  est compensée de la même manière en partant de la forme de miroir déformable précédemment déterminée. Ce processus est répété  $N$  fois jusqu'à compensation de l'ensemble des aberrations optiques choisies. Un exemple d'évolution du facteur de mérite au cours du processus d'optimisation est donné à la figure 3.9. Le facteur de mérite décroît au fur et à mesure de la compensation successive des différentes aberrations optiques à corriger.

#### 3.2.1.2 Le choix du facteur de mérite

Le choix du facteur de mérite dépend fortement des caractéristiques de l'échantillon et de la technique d'illumination [164]. Pour l'imagerie de billes fluorescentes, les facteurs de mérite traditionnellement utilisés sont basés sur les filtres de Sobel et Laplace. Le filtre de Sobel

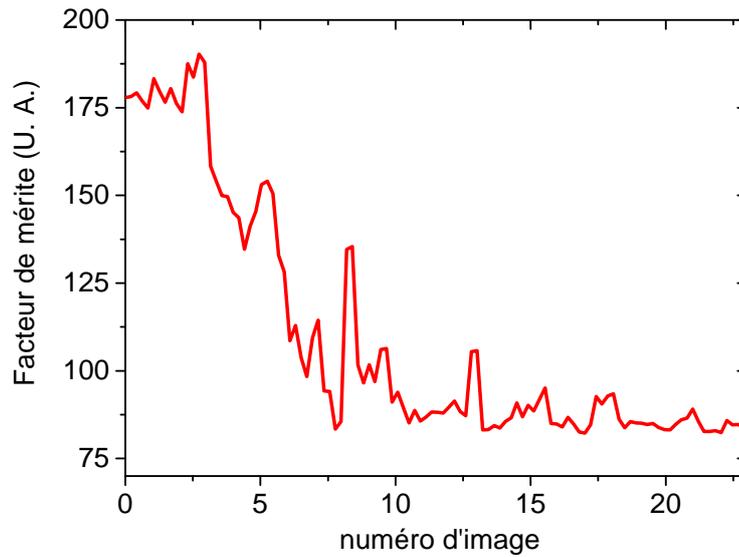


FIGURE 3.9 – Évolution du facteur de mérite au cours du processus d'optimisation avec l'algorithme  $3N$ ,  $N = 5$ .

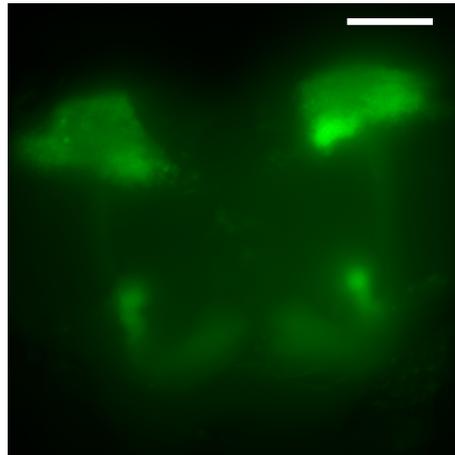


FIGURE 3.10 – Imagerie *in vivo* plein champ des corps pédonculés d'une drosophile de génotype 238Y-GAL4,UAS-CD8-GFP. L'image présentée est une projection maximale d'intensité sur  $80 \mu\text{m}$  de profondeur. Barre d'échelle :  $50 \mu\text{m}$ .

correspond au calcul du gradient de l'intensité de chaque pixel de l'image  $I$ . Le facteur de mérite, associé au filtre de Sobel, est donné par la relation :

$$M_{\text{Sobel}} = \left( \iint \sqrt{\left| \frac{\partial I}{\partial x} \right|^2 + \left| \frac{\partial I}{\partial y} \right|^2} dx dy \right)^{-1}. \quad (3.5)$$

### Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

---

Le facteur de mérite, associé au filtre de Laplace, s'exprime quant à lui sous la forme :

$$M_{\text{Laplace}} = \left( \iint \left| \frac{\partial^2 I}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 I}{\partial y^2} \right| dx dy \right)^{-1}. \quad (3.6)$$

L'imagerie conventionnelle plein champ *in vivo* du cerveau de la drosophile conduit à des images de fluorescence relativement bruitées présentant de faibles contrastes du fait d'une grande contribution de la fluorescence provenant des plans défocalisés (figure 3.10). Ainsi, il est très difficile voire impossible d'utiliser les algorithmes d'optimisation traditionnels basés sur les filtres de Sobel ou de Laplace. Des objets de référence doivent donc être insérés dans le cerveau. Néanmoins, pour les raisons évoquées dans la section 3.1.3.3, l'insertion de billes fluorescentes n'est pas une option envisageable dans notre cas. Afin de préserver au maximum l'intégrité du cerveau de la drosophile, nous avons opté pour un autre type d'"étoile guide", à savoir le motif d'illumination structurée utilisé pour l'imagerie HiLo. Dans ce cas, le terme "étoile guide" est employé pour désigner un objet artificiel qui va permettre l'optimisation, et non dans le sens d'une introduction de billes fluorescentes micrométriques dont on détecterait le front d'onde émis pour corriger les aberrations optiques. L'utilisation de la modulation de l'illumination comme "étoile guide" présente un double intérêt. Cette structuration de la lumière excitatrice est naturellement présente dans la technique de microscopie à illumination structurée de type HiLo même sans volonté de corriger les aberrations et ne constitue donc pas un ajout artificiel. De plus, la structuration est étendue spatialement et permet donc une optimisation plein champ plus aisée. L'utilisation d'un motif d'illumination périodique est adaptée à la définition mathématique d'un facteur de mérite car on connaît l'image idéale qui serait obtenue en l'absence de toute aberration optique. Le facteur de mérite, utilisant la structuration de l'illumination comme "étoile guide", est alors défini comme l'intégrale de la densité spectrale de puissance dans l'espace de Fourier. Il est calculé pour chaque image dans une fenêtre centrée sur la fréquence des pics correspondant à la structuration périodique de l'illumination. Le facteur de mérite,  $M_{\text{TF}}$ , est calculé comme suit :

$$M_{\text{TF}} = \left( \iint |G(k_x, k_y) \mathcal{F}(I)|^2 dk_x dk_y \right)^{-1}, \quad (3.7)$$

où  $\mathcal{F}(I)$  est la transformée de Fourier de l'image  $I$ .  $G$  est un filtre gaussien de largeur  $2\sqrt{2 \ln 2}w$  centré sur la fréquence spatiale  $(k_{\text{gx}}, k_{\text{gy}})$  du motif d'illumination, c'est-à-dire :

$$G(k_x, k_y) = \exp \left[ -\frac{(k_x - k_{\text{gx}})^2 + (k_y - k_{\text{gy}})^2}{2w^2} \right]. \quad (3.8)$$

Ainsi, minimiser le facteur de mérite est équivalent à maximiser le contraste du motif dans les images acquises à la caméra. Ce facteur de mérite nécessite une superposition parfaite du plan de projection du motif d'illumination et du plan imagé. Le choix de la fréquence spatiale du motif est dicté par deux contraintes qui s'opposent. Si la fréquence est proche de la moitié de la fréquence de coupure du microscope, la capacité de sectionnement optique est grande [120] mais le contraste du motif est faible conduisant à une mesure du facteur de mérite très bruitée et donc à une convergence rendue difficile de l'algorithme d'optimisation. Au contraire, si la fréquence du motif d'illumination est basse, le contraste du motif sera meilleur

mais son extension spatiale axiale ne permettra pas de discriminer les basses fréquences du plan de mise au point des autres. De plus, la période spatiale du motif d'illumination doit être choisie inférieure à la taille des structures à imager dans le cerveau de la drosophile. Les fréquences spatiales des motifs utilisés dans cette étude sont comprises entre 18% et 36% de la fréquence de coupure du microscope. L'efficacité de l'algorithme d'optimisation dépend aussi de la largeur  $w$  du filtre gaussien utilisé pour calculer le facteur de mérite. Cette largeur est choisie empiriquement et sa valeur a été prise à environ 2 % de la fréquence de coupure du microscope.

### 3.2.2 La base de décomposition des aberrations

La base utilisée pour décomposer le front d'onde aberrant est la base des polynômes de Zernike décrite dans la section 3.1.2.1. Une normalisation des polynômes de Zernike, notés  $Z(\rho, \varphi)$ , consiste à considérer que  $\sigma(Z(\rho, \varphi)) = 1$  et  $\langle Z(\rho, \varphi) \rangle = 0$ , où  $\sigma$  et  $\langle \rangle$  correspondent respectivement à la déviation standard et à la moyenne calculées sur la pupille. Le "poids"  $p_i$ , positif ou négatif, d'un polynôme de Zernike dans la décomposition d'un front d'onde est représentée par son amplitude RMS, notée  $\sigma_{\text{RMS},i}$  (pour "Root Mean Square", écart quadratique moyen), telle que :

$$\sigma_{\text{RMS},i} = |p_i|. \quad (3.9)$$

L'amplitude RMS s'exprime en unités de longueur, généralement en micromètres ou en nanomètres, ou en unités de longueur d'onde comme nous le verrons dans la section 3.3.2. L'amplitude RMS du front d'onde,  $\sigma_{\text{RMS}}$ , est calculée selon la formule :

$$\sigma_{\text{RMS}} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \sigma_{\text{RMS},i}^2}, \quad (3.10)$$

où  $N$  correspond au nombre de polynômes de Zernike utilisés dans la base.

### 3.2.3 Le montage optique

Le dispositif optique a été construit autour d'un microscope de fluorescence commercial (Olympus IX 71) permettant d'assurer une bonne stabilité mécanique dans le temps. Le dispositif optique est schématisé sur la figure 5.1. Le miroir déformable (Imagine Optic, Mirao 52 E) est placé dans un plan conjugué de la pupille de sortie de l'objectif de microscope (Leica HC Fluotar L 25×/0.95 ON W VISIR, immersion à eau). L'"étoile guide" choisie pour le processus d'optimisation étant une structuration de l'illumination à l'excitation, il est indispensable de corriger simultanément les aberrations optiques des voies d'illumination et d'imagerie de la fluorescence. Nous avons donc placé le miroir déformable à une position commune aux voies d'excitation et d'émission. Cette configuration permet alors de corriger à la fois les aberrations optiques présentes sur la voie d'imagerie mais également celles présentes entre la matrice de micro-miroirs (DLP Texas Instruments Discovery 4100 0.7 XGA) et l'échantillon. Le premier télescope permet de placer le miroir déformable (DM) à l'extérieur du support du microscope tandis que le second télescope sert à adapter la taille

### Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

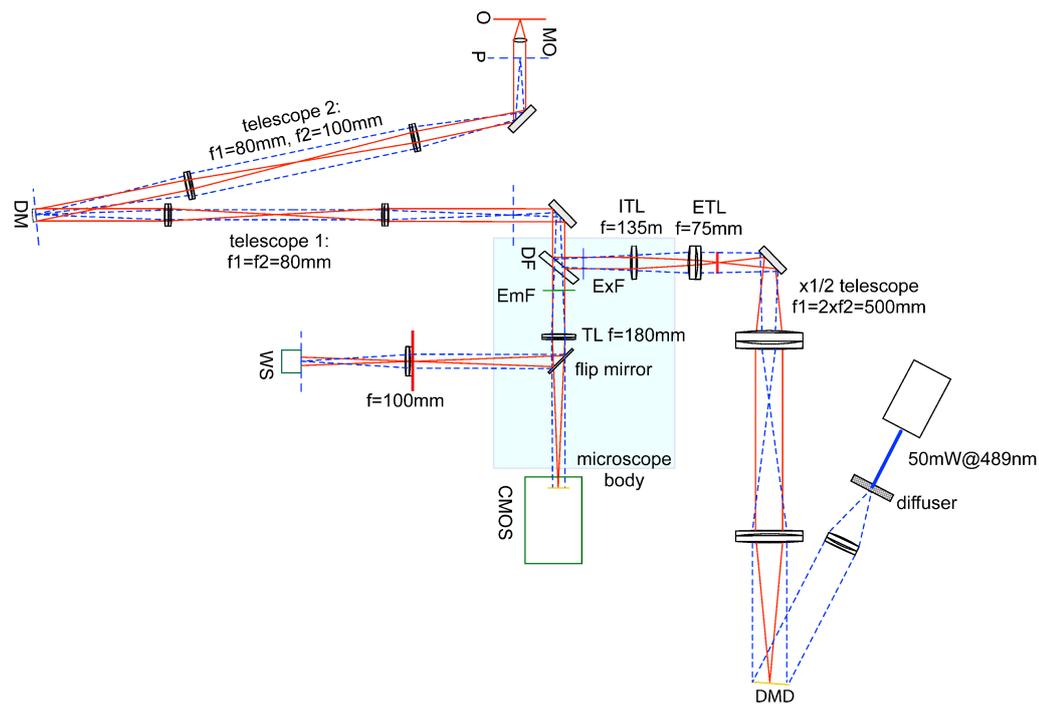


FIGURE 3.11 – Schéma du dispositif expérimental de microscopie à illumination structurée combinée à l'optique adaptative. La voie d'excitation se compose principalement d'une diode laser et d'une matrice de micro-miroirs (DMD). La correction d'aberrations est réalisée grâce à un miroir déformable (DM), placé à une position commune aux voies d'excitation et d'émission. Un capteur CMOS permet l'imagerie des signaux de fluorescence. L'analyseur de front d'onde (WS) est seulement utilisé pour corriger les aberrations statiques du dispositif optique. Les lignes bleues et rouges, perpendiculaires à l'axe du faisceau, correspondent respectivement aux plans conjugués du miroir déformable et du plan objet. Les notations MO, TL, DF, P, O, ETL, ITL, ExF and EmF sont utilisées pour : objectif de microscope, lentille de tube, miroir dichroïque, plan de la pupille de sortie de l'objectif de microscope, plan de l'objet, lentille de tube externe, lentille de tube d'illumination, filtre d'excitation et filtre d'émission.

de ce miroir à celle de la pupille de l'objectif afin d'utiliser au maximum ses actuateurs. Ces deux télescopes sont constitués de doublets achromatiques de diamètre 1 pouce. La matrice de micro-miroirs, située dans un plan conjugué du plan focal de l'objectif de microscope, permet de structurer la lumière excitatrice (Cube laser 488 nm 50 mW, Coherent). Un diffuseur de speckle est utilisé pour réduire la cohérence spatiale de la source. La lumière excitatrice et l'émission de fluorescence sont séparées spectralement grâce à un miroir dichroïque (Z488RDC, Chroma Technology) et un filtre passe-haut est utilisé pour l'émission de fluorescence (500LP, Chroma Technology). Les images de fluorescence sont enregistrées sur un capteur CMOS (Hamamatsu, Orca-Flash 4.0). Il est également possible grâce à un miroir orientable de diriger l'émission de fluorescence vers un analyseur de front d'onde de type Shack-Hartmann (Imagine Optic, HASO 3 first), noté WS sur la figure 5.1. Cet analyseur de front d'onde est dans un plan conjugué du plan de la matrice de micro-miroirs. Cette conjugaison est

## Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

---

obtenue grâce à la lentille ( $f = 100$  mm) entre le miroir dichroïque et le Shack-Hartmann. La distance focale de cette lentille a été choisie de façon à adapter la taille du capteur de l'analyseur de front d'onde au diamètre de la pupille de l'objectif de microscope. Cette lentille ne faisant ni partie de la voie d'excitation, ni de la voie d'émission de fluorescence, elle est placée dans un plan conjugué de l'échantillon afin de diminuer son impact sur le front d'onde.

Dans notre dispositif, l'analyseur de front d'onde est seulement utilisé pour corriger les aberrations statiques du dispositif optique entre l'objectif du microscope et le miroir dichroïque. Cette étape est réalisée, en boucle fermée, avec l'analyseur de front d'onde comme senseur et le miroir déformable comme actuateur sur des billes fluorescentes de taille micrométrique. Une bille isolée est placée au centre du champ et la forme du miroir déformable est optimisée de façon à aplanir le front d'onde provenant de cette bille. Ce réglage préliminaire n'est pas indispensable mais permet, en découplant les aberrations du système optique et celles introduites par l'échantillon, de faciliter ensuite l'optimisation du facteur de mérite. Typiquement, seuls 10% de la course du miroir déformable sont utilisés pour corriger les aberrations introduites par le dispositif optique seul, laissant la possibilité de corriger des échantillons plus aberrants. Pour le pilotage du miroir déformable, nous avons besoin d'enregistrer une matrice de commande qui est calculée par inversion de la matrice d'interaction. Cette matrice d'interaction indique l'effet des différents actionneurs du miroir déformable sur le front d'onde. Elle est déterminée en mesurant le front d'onde d'une bille fluorescente isolée lorsque les différents actionneurs du miroir déformable sont sollicités [165]. Pour cela est appliquée séquentiellement, sur chacun des 52 actionneurs, une tension de consigne négative puis positive afin de les pousser et les tirer. Le front d'onde résultant de chacune de ces manipulations est mesuré. La matrice d'interaction est déterminée avant chaque expérience afin de compenser une éventuelle dérive mécanique du microscope. L'inversion de cette matrice construit la matrice de commande qui permet de déterminer quels sont les actionneurs à utiliser pour corriger un mode d'aberration donné du front d'onde.

### 3.3 Résultats : Caractérisation et performances du système

Les expériences présentées ici ont pour but de confirmer l'adaptation du dispositif expérimental d'optique adaptative {montage optique + algorithme d'optimisation} à l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile. L'étendue spatiale tridimensionnelle ainsi que la stabilité temporelle de la correction, qui sont des paramètres très importants pour l'imagerie du vivant, ont été par exemple estimées.

#### 3.3.1 Évaluation des aberrations différentielles entre voies d'excitation et d'émission

La microscopie de fluorescence HiLo étant basée sur la structuration de l'illumination, les aberrations présentes sur les voies d'excitation et d'émission doivent être simultanément corri-

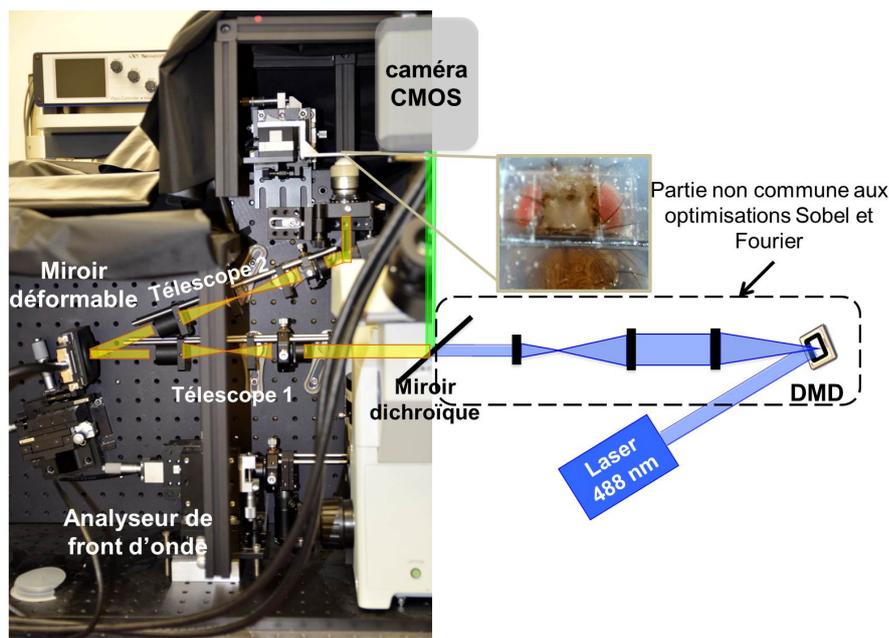


FIGURE 3.12 – Photographie de la partie du dispositif assurant la correction d’aberrations. En bleu et vert sont représentés les faisceaux d’excitation et d’émission de fluorescence. Le chemin commun à l’excitation et à l’émission est symbolisé en jaune. DMD : matrice de micro-miroirs.

gées afin de projeter un motif bien contrasté dans l’échantillon mais également d’augmenter la qualité des signaux de fluorescence enregistrés. Néanmoins, ces deux voies sont seulement communes entre le miroir dichroïque et l’échantillon comme il peut être observé sur la figure 3.12 (portion représentée en jaune). Il est donc absolument nécessaire de s’assurer qu’aucune aberration différentielle entre les voies d’excitation et d’émission n’est présente, ce qui diminuerait l’efficacité de l’optimisation simultanée de ces deux voies. Pour estimer ce taux d’aberration différentielle, nous avons imagé un échantillon d’agarose contenant des billes fluorescentes vertes de diamètre  $1\ \mu\text{m}$  et procédé à deux optimisations avec des facteurs de mérite différents. Le facteur de mérite basé sur le filtre de Sobel,  $M_{\text{Sobel}}$ , défini dans l’équation 3.5 est sensible à la qualité de l’image et non à celle de l’illumination. Que l’optimisation soit réalisée en illumination ou en illumination structurée avec le facteur de mérite  $M_{\text{Sobel}}$ , le résultat est inchangé (données non présentées). Ce facteur de mérite est en effet calculé en utilisant un noyau de filtre de  $3 \times 3$  pixels ce qui est environ cinq fois plus petit que la période spatiale du motif d’illumination qui s’étend ici sur 14 pixels. De plus, la grille initialement de forme créneau au niveau de la matrice de micro-miroirs module l’intensité au niveau de l’échantillon de manière plutôt sinusoïdale avec des variations peu abruptes. Cela vient du fait que les différents éléments optiques du dispositif diaphragment le faisceau ce qui supprime les harmoniques d’ordres les plus élevés du motif d’illumination. Ainsi, le critère de mérite de Sobel est beaucoup moins sensible à ce motif de relativement basse fréquence spatiale qu’aux fortes discontinuités d’intensité dans l’image. Il permet donc l’optimisation optique du chemin entre l’échantillon et la caméra, ce qui correspond à la voie d’émission. Le second facteur de mérite utilisé,  $M_{\text{TF}}$ , dont l’expression est donnée dans la formule 3.7, est sensible aux aberrations optiques présentes entre la matrice de micro-miroirs, qui façonne le faisceau d’excitation, et la caméra, en passant par l’échantillon.

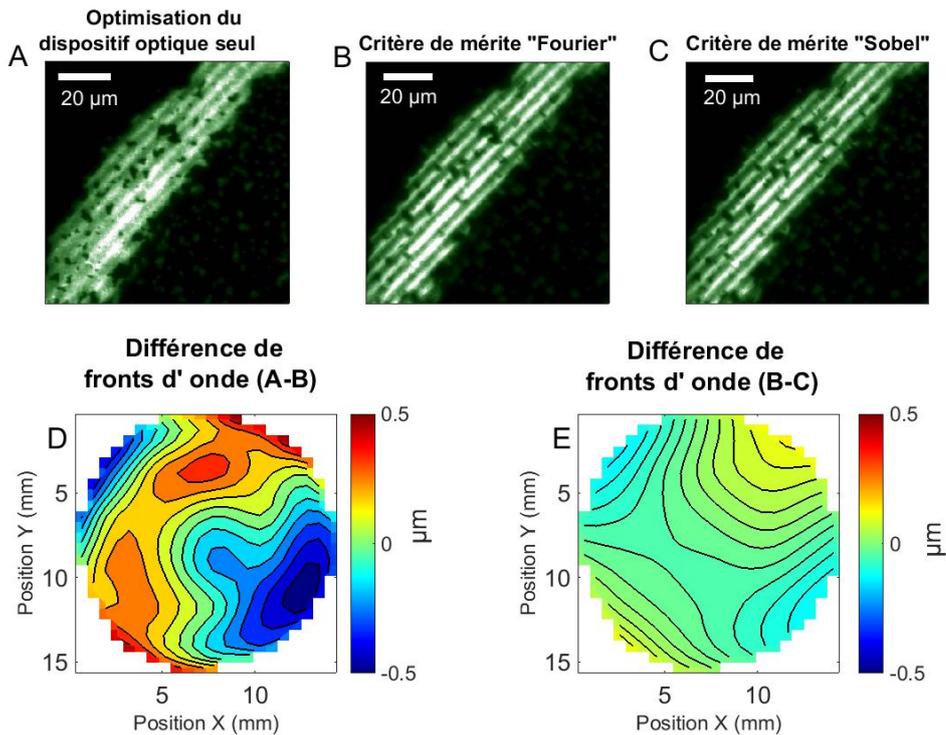


FIGURE 3.13 – Optimisation d’images d’une bande dense de billes fluorescentes vertes de diamètre  $1 \mu\text{m}$  contenues dans un gel d’agarose de concentration massique 1%. (A) Image obtenue en corrigeant seulement les aberrations du dispositif optique. Barre d’échelle :  $20 \mu\text{m}$ . (B) Image obtenue après optimisation du facteur de mérite  $M_{\text{TF}}$ . (C) Image obtenue après optimisation du facteur de mérite  $M_{\text{Sobel}}$ . (D) Front d’onde différentiel entre les formes de miroir déformable obtenues après optimisation du dispositif optique seul et après optimisation du facteur de mérite  $M_{\text{TF}}$ . (E) Front d’onde différentiel entre les formes de miroir déformable obtenues après optimisation des facteurs de mérite  $M_{\text{TF}}$  et  $M_{\text{Sobel}}$ .

Une optimisation en utilisant ce facteur de mérite permet donc de corriger les aberrations optiques du chemin complet composé des voies d’excitation et d’émission. Si les optimisations, basées sur ces deux facteurs de mérite, conduisent à la même forme pour le miroir déformable, alors on pourra en conclure qu’il n’y a pas d’aberration différentielle entre les voies d’excitation et d’émission. Nous avons imagé un motif de grille projeté sur un échantillon dense de billes et enregistré les formes de miroir déformable résultant des optimisations avec les deux facteurs de mérite présentés. Les résultats sont montrés à la figure 3.13. Une amélioration du contraste est visible entre le cas où seules les aberrations du système optique sont corrigées (figure 3.13A) et les situations où les aberrations optiques introduites par l’échantillon sont également minimisées (figures 3.13B et C). L’optimisation avec le facteur de mérite Fourier,  $M_{\text{TF}}$ , conduit à une variation de  $150 \pm 20 \text{ nm RMS}$  de la forme du miroir déformable par rapport au cas où seules les aberrations du système sont corrigées (figure 3.13D). Une aberration différentielle de  $50 \pm 20 \text{ nm RMS}$  est obtenue en comparant les formes de miroir déformable à la suite des deux optimisations (figure 3.13E). La principale contribution à l’aberration différentielle entre les deux optimisations est l’astigmatisme à  $45^\circ$  (figure 3.14). Le miroir dichroïque est l’élément

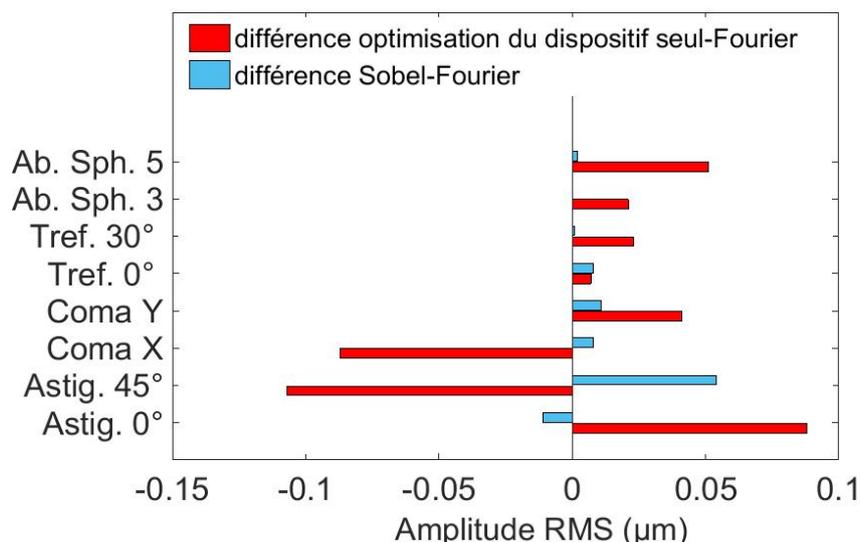


FIGURE 3.14 – Décomposition en termes d’aberrations des différences de fronts d’onde présentées sur les figures 3.13D et E.

optique le plus à même de contribuer aux aberrations différentielles car il est utilisé en réflexion pour l’excitation et en transmission pour la fluorescence. Notamment, la manière dont celui-ci est placé dans son support et les contraintes mécaniques associées peuvent donner lieu à de l’astigmatisme. Toutefois, nous verrons dans les sections à venir que cette contribution résiduelle de l’astigmatisme à 45° provient plutôt d’une très faible sensibilité de la valeur du facteur de mérite  $M_{TF}$  à cette aberration. Si l’on ne prend pas en compte l’astigmatisme à 45° dans le calcul de l’amplitude RMS du front d’onde, on obtient, avec l’équation 3.10, seulement 20 nm RMS entre les formes du miroir déformable optimisées séquentiellement avec les facteurs de mérite Sobel et Fourier. Cette valeur est à comparer à celle du bruit. Expérimentalement, l’amplitude du bruit associé aux facteurs de mérite équivaut à environ 10 nm RMS d’aberration. Ainsi, chaque forme de miroir déformable est obtenue avec cette incertitude soit 20 nm pour la différence des formes de miroir déformable obtenues pour les deux optimisations. Cette étude montre donc que les aberrations différentielles ne jouent pas un rôle significatif dans la réduction des aberrations optiques. Ainsi, les voies d’excitation et d’émission peuvent bien être optimisées simultanément en utilisant un seul miroir déformable positionné à la fois sur le chemin d’excitation et sur la voie d’émission de la fluorescence.

### 3.3.2 Évaluation de l’extension spatiale latérale de la correction

Récemment, il a été prouvé qu’une plus grande efficacité de correction des aberrations optiques introduites par l’échantillon, en termes d’extension spatiale, peut être obtenue en ne plaçant pas le miroir déformable dans un plan conjugué de la pupille de sortie de l’objectif de microscope [166, 167], mais conjugué des régions aberrantes optiquement à corriger dans l’échantillon, à condition de connaître leur position axiale. Comme nous n’avons pas cette connaissance pour notre échantillon biologique, nous avons opté pour la configuration tradi-

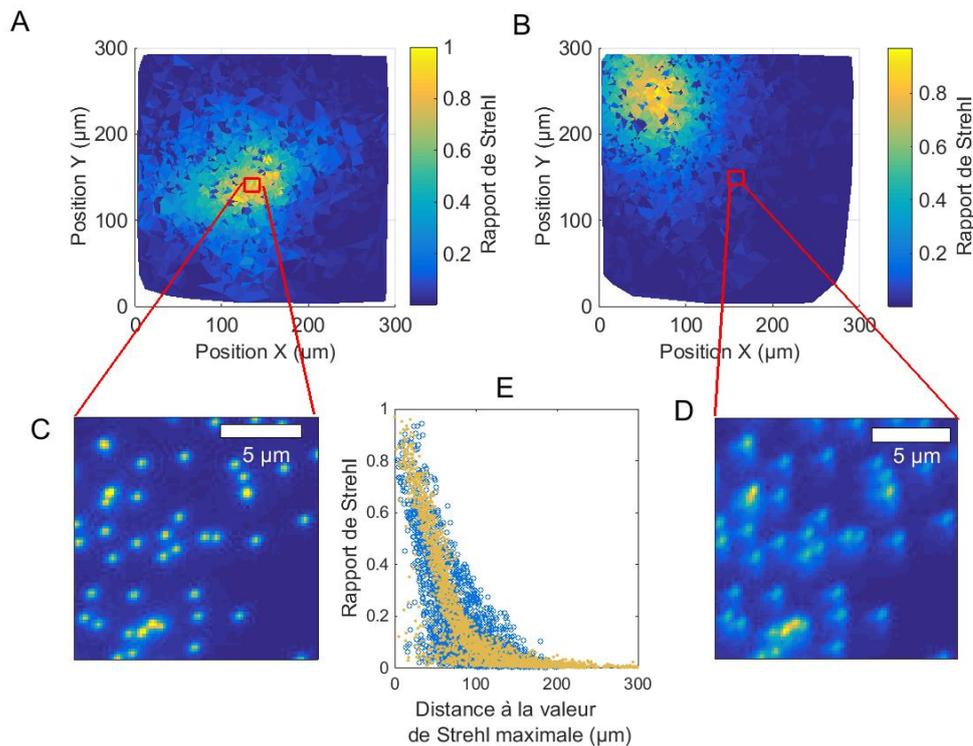


FIGURE 3.15 – Détermination de cartes de rapports de Strehl dans tout le champ imagé. (A) Carte de rapports de Strehl pour une correction d’aberrations autour d’une bille fluorescente au centre du champ.  $n = 2382$  billes pour la reconstruction de la carte. (B) Carte de rapports de Strehl pour une correction d’aberrations autour d’une bille fluorescente située dans le coin supérieur gauche du champ.  $n = 2170$  billes pour la reconstruction de la carte. (C) Image des billes du centre du champ lorsque la correction d’aberrations est appliquée autour d’une bille située au centre du champ. Barre d’échelle :  $5 \mu\text{m}$ . (D) Image des billes du centre du champ lorsque la correction d’aberrations est appliquée autour d’une bille située dans le coin supérieur gauche du champ. (E) Graphique représentant le rapport de Strehl en fonction de la distance par rapport à la position spatiale où le rapport de Strehl est maximal et cela pour les deux corrections : au centre du champ (bleu) et dans le coin supérieur gauche (jaune).

tionnelle où le miroir déformable et la pupille de sortie de l’objectif de microscope sont dans des plans conjugués. Ainsi, le front d’onde à corriger est la superposition de tous les fronts d’onde émis depuis le plan de l’image. Si l’échantillon est inhomogène latéralement alors l’optimisation réalisée avec un seul miroir déformable ne sera pas en mesure de corriger l’ensemble des distortions du front d’onde dans le champ. Afin de déterminer l’extension spatiale latérale de la zone qui peut être corrigée, nous avons déposé des billes fluorescentes vertes de diamètre 200 nm (FluoSpheres, Molecular Probes) à la surface d’une lamelle de verre, et procédé à l’optimisation sans mesure de front d’onde en utilisant le facteur de mérite basé sur le filtre de Sobel,  $M_{\text{Sobel}}$ . Cette méthode a été réalisée sur deux billes différentes : une bille située au centre du champ imagé et une bille située dans le coin supérieur gauche du champ. Nous avons alors estimé le rapport de Strehl [168] de chacune des billes du champ. Le rapport de Strehl est une mesure de la qualité d’une image optique qui fut introduite par Karl Strehl, et qui va nous permettre

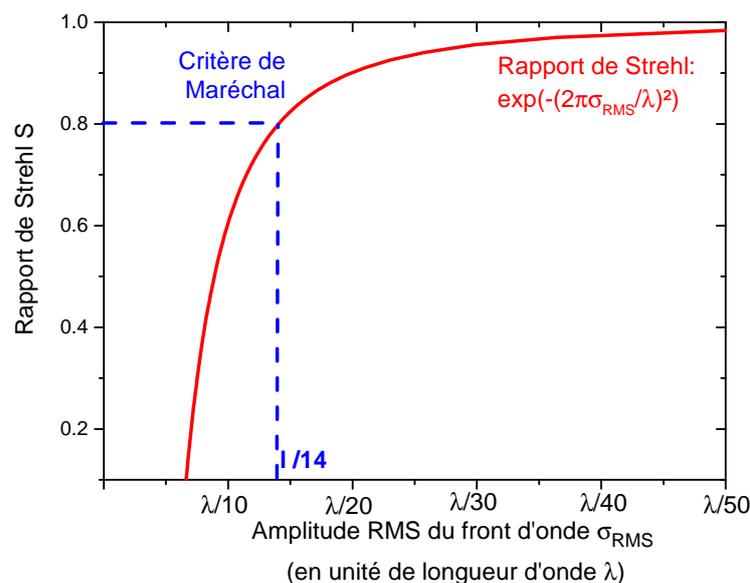


FIGURE 3.16 – Évolution du rapport de Strehl en fonction de l’amplitude RMS du front d’onde aberrant. La valeur de l’amplitude RMS  $\sigma_{\text{RMS}}$  est exprimée en unité de longueur d’onde.

de déterminer l’efficacité du système d’optique adaptative. Sa valeur est comprise entre 0 et 1. Pour un système optique dénué de toute aberration, la valeur du rapport de Strehl est 1. Mathématiquement, il est traditionnellement défini comme étant le rapport des intensités maximales de la fonction d’étalement du point et de la tache d’Airy, valeur idéale obtenue si le système est uniquement limité par diffraction. La mesure de ce rapport est néanmoins plus compliquée qu’il n’y paraît. Comme les billes sont imagées sur environ 4 pixels de la caméra, l’estimation de l’intensité maximale de la PSF est assez imprécise. Nous avons alors décidé de calculer le rapport de Strehl en mesurant la taille de l’image des billes et non l’intensité maximale. Pour ce faire, la position du barycentre de chaque bille est déterminée et le rayon de leur image est estimé par une modélisation gaussienne. Des images idéales de billes de diamètre 200 nm sont ensuite simulées aux positions déterminées précédemment et leur rayon est également estimé par modélisation gaussienne. Les résultats des modélisations sont corrigés afin de tenir compte de la taille des billes et de l’effet de la pixellisation (échantillonnage et position du barycentre). À intensité totale constante, la valeur pic de l’intensité étant inversement proportionnelle à la surface de l’image de la bille, on peut alors définir le rapport de Strehl comme étant le rapport de la surface de l’image de la bille sans aberration optique sur celle effectivement mesurée. L’ensemble des valeurs de rapports de Strehl mesurées sur les billes dans le champ d’observation sont reportées sous forme d’une cartographie et présentées sur les figures 3.15A et B. Les figures 3.15C et D montrent respectivement l’image de billes proches du centre de la zone corrigée et éloignées de 150  $\mu\text{m}$  de cette zone. Le rapport de Strehl est maximal au niveau de l’“étoile guide”, que celle-ci soit choisie au centre ou en bordure de champ, et décroît lorsqu’on s’en éloigne. Cette décroissance peut être quantifiée en traçant l’évolution du rapport de Strehl en fonction de la distance à l’“étoile guide”. Le résultat est présenté sur la figure 3.15E. Il est à noter que le rapport de Strehl  $S$  peut également être quantifié en terme de déformation du

front d'onde selon la formule :

$$S = \exp\left(-\left(\frac{2\pi\sigma_{\text{RMS}}}{\lambda}\right)^2\right), \quad (3.11)$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde des radiations à l'émission et  $\sigma_{\text{RMS}}$  est l'amplitude RMS du front d'onde définie dans la section 3.2.2. Le graphique de la figure 3.16 présente l'évolution de la valeur du rapport de Strehl  $S$  en fonction de l'amplitude RMS du front d'onde  $\sigma_{\text{RMS}}$  exprimée en unités de longueur d'onde. Selon le critère de Maréchal [169], un rapport de Strehl supérieur à 0.8 peut être considéré comme satisfaisant pour un système d'imagerie, ce qui correspond à une amplitude RMS du front d'onde aberrant inférieure à  $\lambda/14$ . Dans notre expérience, la zone effectivement corrigée, pour laquelle le rapport de Strehl est supérieure à 0.8, est un disque de rayon environ égal à 20  $\mu\text{m}$  autour de l'“étoile guide” (figure 3.15E). Ainsi, l'ensemble du champ ne peut pas être corrigé simultanément. Néanmoins, la dimension de cette surface isoplanétique reste compatible avec la taille des sous-régions d'intérêt que l'on souhaite observer dans le cerveau de la drosophile. Le facteur de mérite,  $M_{\text{TF}}$ , qui sera utilisé pour la correction des aberrations optiques introduites par le cerveau de la drosophile, sera alors déterminé latéralement dans une sous-région du champ total afin d'assurer une bonne efficacité de correction.

### 3.3.3 Évaluation de l'extension spatiale axiale de la correction dans le cerveau de la drosophile

Le cerveau de la drosophile étant tridimensionnel, il est nécessaire de caractériser l'extension spatiale dans la direction axiale de l'efficacité de la correction d'aberrations. Comme présenté au Chapitre 2, la région d'intérêt dans le cerveau de la drosophile est celle des corps pédonculés. La lignée transgénique de drosophiles utilisée dans ce chapitre est *238y-GAL4,UAS-CD8-GFP*, exprimant le rapporteur fluorescent GFP au niveau des membranes de l'ensemble des neurones des corps pédonculés. Afin de déterminer l'efficacité de la correction, la qualité optique du motif d'illumination sur les images de fluorescence a été testée, et cela pour différentes profondeurs dans le cerveau de la drosophile : 30, 40 et 50  $\mu\text{m}$  sous la surface. La période typique de la grille d'illumination est de 2.5  $\mu\text{m}$  au niveau de l'échantillon. Pour chacune de ces profondeurs dans le cerveau, la grille a été imagée en appliquant au miroir déformable la forme permettant de corriger uniquement les aberrations du système optique. Des optimisations aux différentes profondeurs ont ensuite été menées en utilisant le facteur de mérite  $M_{\text{TF}}$  précédemment défini. Afin de quantifier la qualité visuelle de la grille dans les images de fluorescence, nous avons calculé le contraste du motif pour chacune de ces images. L'ensemble des résultats, correspondant aux différentes profondeurs optimisées et imagées dans le cerveau de la drosophile, sont résumés dans la figure 3.17. Cette figure se lit comme suit : par exemple, la valeur de contraste du motif de la grille détectée de 0.88 correspond à une image enregistrée à 30  $\mu\text{m}$  de profondeur dans le cerveau mais avec une optimisation et correction des aberrations à 40  $\mu\text{m}$  de profondeur. En ne corrigeant que les aberrations optiques du système, le contraste de la grille diminue si rapidement avec l'épaisseur de cerveau traversée qu'au delà de 30  $\mu\text{m}$ , il devient impossible d'utiliser la microscopie à illumination structurée sans optique adaptative.

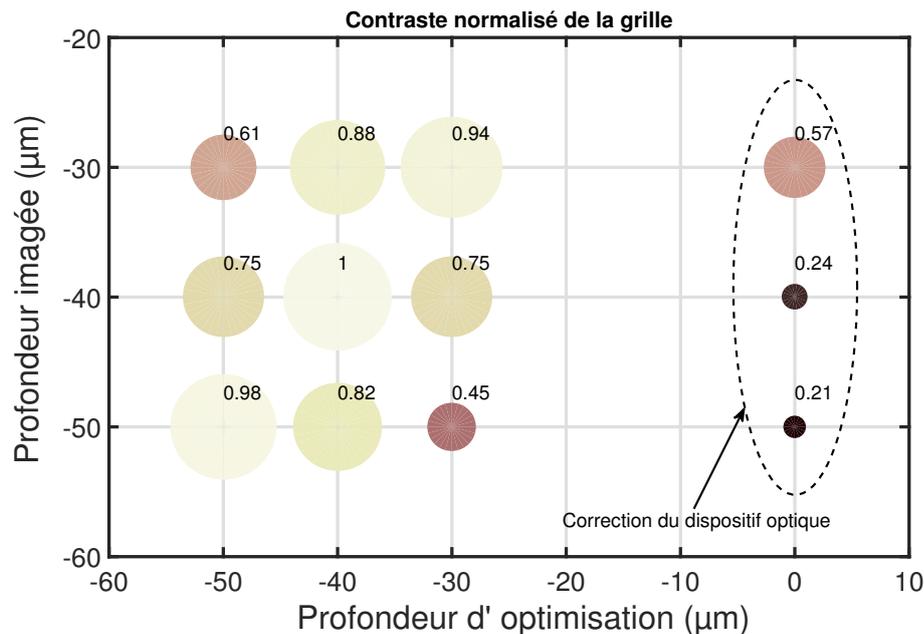


FIGURE 3.17 – Évaluation du contraste normalisé du motif d’illumination structurée (en fluorescence) jusque  $50 \mu\text{m}$  de profondeur dans le cerveau de la drosophile, en corrigeant soit uniquement les aberrations du dispositif optique, soit les aberrations optiques provenant du dispositif ainsi que de l’échantillon. Trois profondeurs dans le cerveau de la drosophile ont été imagées :  $30$ ,  $40$  and  $50 \mu\text{m}$  sous la surface. Pour chacune de ces profondeurs, l’algorithme d’optimisation  $3N$  a été utilisé avec le facteur de mérite  $M_{TF}$ . Les modes d’aberrations corrigés sont : les aberrations sphériques du troisième et du cinquième ordre, l’aberration de coma, le trefoil et l’astigmatisme. La formule utilisée pour le calcul du contraste est donnée dans l’équation 2.21 du Chapitre 2. Le contraste a été normalisé à 1 pour sa valeur maximale.

La correction des aberrations nous a permis d’améliorer le contraste du motif d’illumination jusqu’à  $50 \mu\text{m}$  de profondeur. A cette profondeur, une amélioration d’un facteur 5 du contraste de la grille a été obtenue en comparaison du cas où les aberrations optiques introduites par l’échantillon ne sont pas corrigées. On peut également remarquer que si l’optimisation est réalisée à la profondeur que l’on veut imager, il n’y a pas de diminution du contraste de la grille avec la profondeur, prouvant ainsi l’efficacité de l’optique adaptative pour restaurer la qualité optique dans des échantillons épais. Si l’optimisation est faite  $10 \mu\text{m}$  au-dessus ou en dessous du plan imagé, le contraste de la grille diminue d’environ 20 %. Cette constatation aura une répercussion sur le pas d’optimisation utilisé dans le cas d’une imagerie tridimensionnelle du cerveau de la drosophile corrigée en aberration. Afin de conserver une bonne qualité optique, il sera alors nécessaire d’adapter axialement la correction au minimum tous les  $20 \mu\text{m}$  environ. La figure 3.18 correspond à l’évolution du facteur de mérite  $M_{TF}$  calculé sur des images prises avec une illumination structurée du cerveau de la drosophile depuis la surface jusque  $80 \mu\text{m}$  de profondeur. La recherche de la forme du miroir déformable minimisant les aberrations a été effectuée à  $40 \mu\text{m}$  de profondeur. On constate que c’est bien à cette profondeur que le facteur de mérite est minimal, ce qui correspond à un contraste maximal de la grille dans l’échantillon, et que cette correction s’étend sur environ  $20 \mu\text{m}$  autour de la profondeur choisie pour

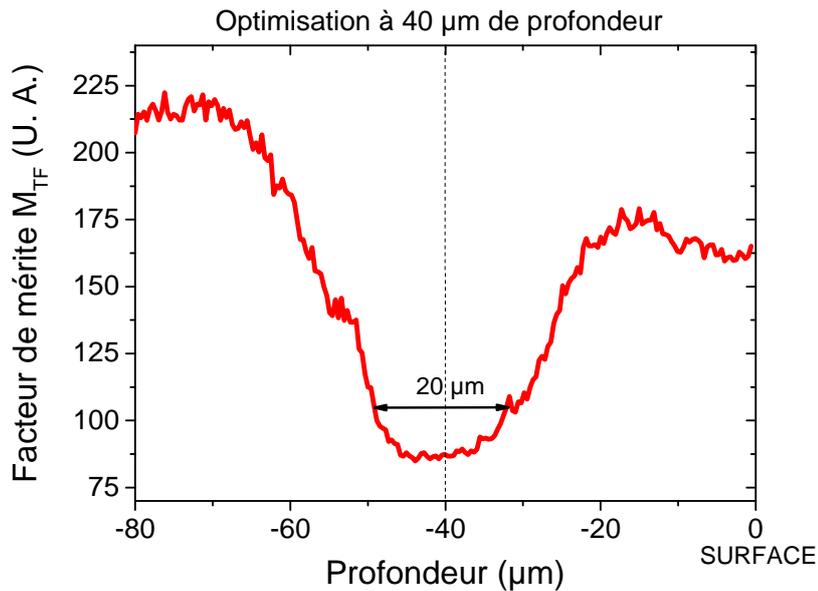


FIGURE 3.18 – Évolution du facteur de mérite  $M_{TF}$  en fonction de la profondeur dans le cerveau de la drosophile. L'optimisation a été réalisée à  $40 \mu\text{m}$  de profondeur.

l'optimisation.

### 3.3.4 Stabilité temporelle de la correction pour l'imagerie *in vivo*

Le comportement temporel de la correction du front d'onde est un élément clé pour l'imagerie *in vivo*. En effet, si les aberrations fluctuent au cours du temps, il sera nécessaire de procéder à des optimisations régulièrement. Nous avons évalué les fluctuations de la forme du miroir déformable, optimisant le facteur de mérite  $M_{TF}$ , en imageant un plan donné dans le cerveau de la drosophile et en procédant à des optimisations toutes les dix minutes pendant une heure. Nous avons choisi cette durée car elle correspond à la durée maximale typique d'une expérience d'imagerie fonctionnelle que j'ai pu réaliser au cours de ma thèse. Les résultats sont montrés sur la figure 3.19. Les amplitudes RMS des différentes aberrations sont données en fonction de leur valeur à  $t = 0$ . Les corrections fluctuent au maximum de quelques centaines de nanomètres excepté l'astigmatisme à  $45^\circ$ . L'évolution erratique de l'astigmatisme à  $45^\circ$  est probablement due à une faible sensibilité du facteur de mérite  $M_{TF}$  à cette aberration. L'effet de l'astigmatisme sur la fonction de transfert du microscope dépend de son orientation et n'a que peu d'effet dans une des directions de l'espace de Fourier [170]. Le facteur de mérite  $M_{TF}$  permet une optimisation spatialement étendue mais correspond dans l'espace de Fourier à l'optimisation d'une région restreinte. La région de l'espace de Fourier optimisée est déterminée par la fréquence et l'orientation du motif projeté. Si cette région correspond à la région où l'astigmatisme à  $45^\circ$  a peu d'effet, alors le facteur de mérite  $M_{TF}$  sera relativement insensible à la présence de cette aberration. Ainsi, la variation prononcée de l'astigmatisme à  $45^\circ$  ne peut pas être attribuée à l'évolution de l'échantillon au cours du temps. Nos mesures suggèrent donc que les aberrations optiques induites par le cerveau de la drosophile sont relativement statiques.

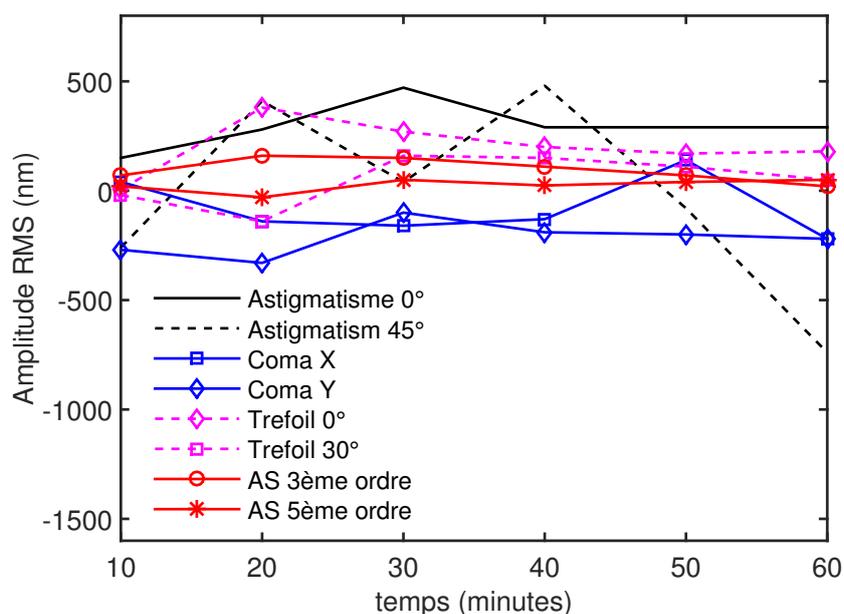


FIGURE 3.19 – Évolution temporelle de l'amplitude RMS des aberrations du troisième ordre (astigmatisme, coma, trefoil et aberration sphérique) et de l'aberration sphérique du 5<sup>ème</sup> ordre pour une profondeur d'imagerie de 30  $\mu\text{m}$  dans le cerveau de la drosophile. AS : aberration sphérique.

### 3.3.5 Dépendance de la fréquence spatiale du motif d'excitation

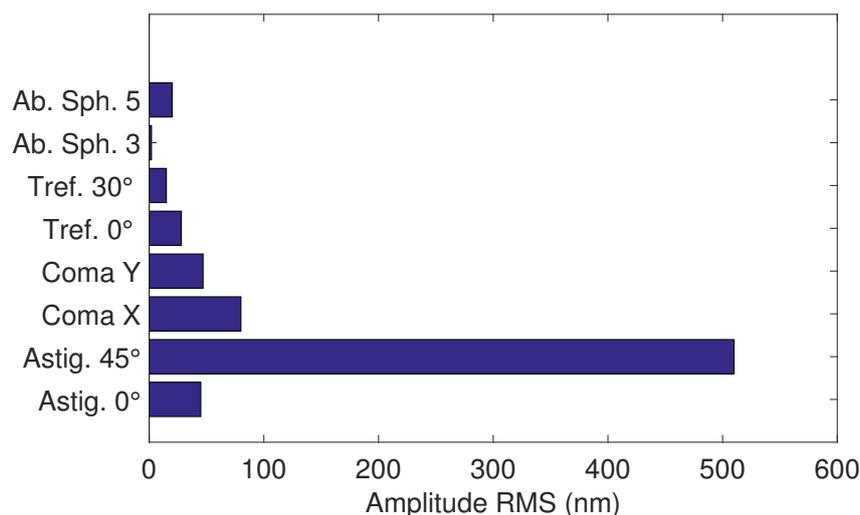


FIGURE 3.20 – Quantification de l'aberration différentielle pour des optimisations avec deux valeurs de périodes de motif différentes : 1.25 et 2.5  $\mu\text{m}$  dans le plan de l'échantillon, pour une profondeur d'imagerie à 40  $\mu\text{m}$  dans le cerveau de la drosophile. Ab. Sph. : aberration sphérique, tref. : trefoil, astig. : astigmatisme.

Nous avons testé l'influence du choix de la fréquence spatiale du motif sur la qualité de l'optimisation. Les deux optimisations ont été réalisées dans des conditions identiques dans le cerveau de la drosophile avec des périodes de motifs de 1.25 et 2.5  $\mu\text{m}$ . La figure 3.20 représente le contenu en aberrations déterminé par différence des formes du miroir déformable obtenues pour les deux optimisations. Pour les deux périodes de grille, les aberrations optiques sont corrigées de façon similaire, avec une différence d'amplitude RMS inférieure à 100 nm, excepté l'astigmatisme à 45°. Pour les deux motifs testés, la fréquence de la grille n'influe pas sur la correction et donc la qualité de l'image corrigée. Néanmoins, pour ce qui est de la reconstruction HiLo ultérieure, la qualité de la coupe optique dépend, comme il a été démontré au Chapitre 2, de la fréquence du motif utilisé.

### 3.4 Résultats : Imagerie HiLo *in vivo* en profondeur dans le cerveau de la drosophile avec correction des aberrations optiques

#### 3.4.1 Amélioration du contraste de la grille

La qualité des images obtenues en microscopie à illumination structurée, notamment leur contenu "basses fréquences", dépend principalement du contraste du motif d'illumination. En effet, l'illumination structurée permet d'assigner une signature spectrale aux composantes de basses fréquences spatiales provenant uniquement du plan de mise au point. Ainsi, la qualité de la reconstruction de sections optiques HiLo est fortement limitée par la présence d'aberrations optiques. Préalablement à toute reconstruction d'images HiLo en profondeur dans le cerveau de la drosophile, il est donc nécessaire de corriger les aberrations afin d'améliorer le contraste de la grille dans l'image prise avec une illumination structurée. La figure 3.21 ne présente qu'un exemple d'imagerie à 40  $\mu\text{m}$  de profondeur mais l'expérience a été reproduite sur sept drosophiles à différentes profondeurs. Si les aberrations optiques introduites par le cerveau ne sont pas corrigées, la qualité d'impression de la grille dans l'échantillon est très mauvaise (figure 3.21A). La correction des aberrations optiques du troisième ordre (astigmatisme, coma, trefoil et aberration sphérique) ainsi que de l'aberration sphérique du cinquième ordre, avec un algorithme basé sur le facteur de mérite  $M_{TF}$  permet d'augmenter le contraste de la grille dans la région sélectionnée (figure 3.21B). Par souci de clarté, les images présentées sur les figures 3.21A et B correspondent aux images prises avec l'illumination structurée, auxquelles on a soustrait les images prises en illumination uniforme. La figure 3.21E présente la densité spectrale de puissance radiale calculée à partir des images des figures 3.21A et B. Ce profil a été déterminé en calculant la densité spectrale de puissance dans des anneaux concentriques autour de la fréquence spatiale du motif d'illumination. Le pic correspondant à cette fréquence spatiale n'est bien visible que dans le cas où les aberrations optiques introduites par le cerveau ont été corrigées. Ainsi, la microscopie à illumination structurée ne peut être efficace à 40  $\mu\text{m}$  de profondeur dans le cerveau de la drosophile qu'à condition de corriger les aberrations optiques.

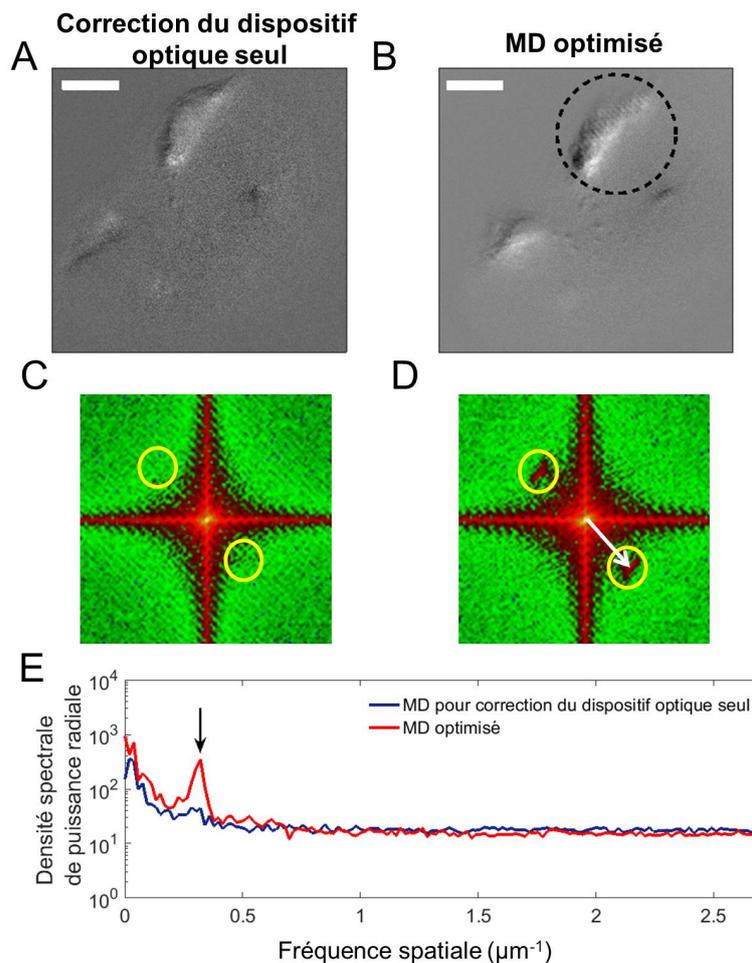


FIGURE 3.21 – Imagerie à illumination structurée des corps pédonculés d’une mouche exprimant le rapporteur fluorescent GFP. (A) Image obtenue en corrigeant uniquement les aberrations du système optique. (B) Image obtenue avec la forme de miroir déformable (MD) optimisant le facteur de mérite  $M_{TF}$ . La zone qui a été optimisée est encerclée. Les images (A) et (B) font 164 par 164  $\mu\text{m}$ . Barre d’échelle : 30  $\mu\text{m}$ . (C) Transformée de Fourier de l’image (A). (D) Transformée de Fourier de l’image (B). Les ronds modélisent l’emplacement des pics correspondant à la fréquence spatiale de la modulation. (E) Densité spectrale de puissance radiale (carré du module de la transformée de Fourier) calculée à partir des images montrées en (A) et (B) en échelle logarithmique. L’intégration a été faite sur un angle de  $7^\circ$  autour du vecteur tracé en (D). La flèche correspond à la fréquence spatiale du motif exprimée dans le plan de l’échantillon.

### 3.4.2 Reconstruction HiLo

Les images acquises précédemment à 40  $\mu\text{m}$  de profondeur, en illumination structurée et uniforme, avec correction des aberrations optiques introduites par l’échantillon, vont permettre de reconstruire des images HiLo. Les résultats de cette reconstruction, dont le principe est expliqué en détail au Chapitre 2, sont présentés sur les figures 3.22A (sans optique adaptative) et B (avec optique adaptative). Afin de quantifier l’amélioration de la qualité de coupe op-

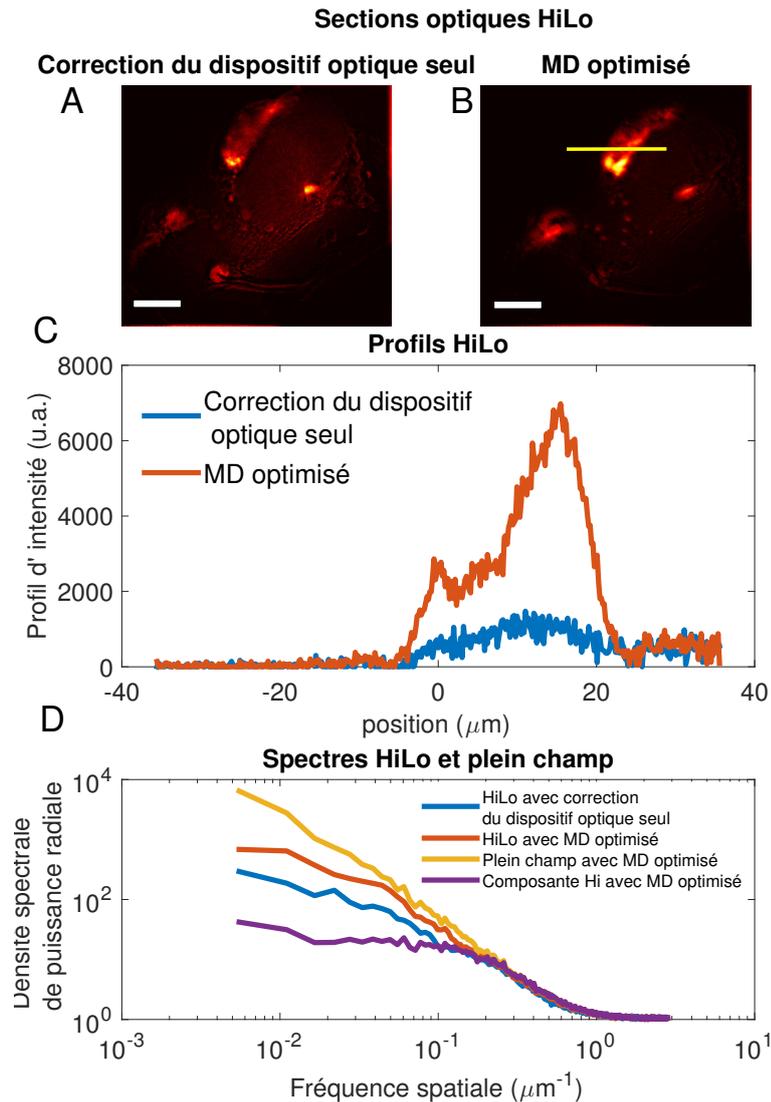


FIGURE 3.22 – Imagerie HiLo à  $40 \mu\text{m}$  de profondeur dans le cerveau de la drosophile. (A) Reconstruction HiLo en ne corrigeant que les aberrations optiques du dispositif. (B) Reconstruction HiLo avec la forme de miroir déformable optimisant le facteur de mérite  $M_{TF}$ . Les images (A) et (B) font  $164$  par  $164 \mu\text{m}$ . Barre d'échelle :  $30 \mu\text{m}$ . (C) Profils d'intensité des images HiLo présentées en (A) et (B). Le profil est tracé le long de la ligne représentée en (B). MD : miroir déformable. (D) Densité spectrale de puissance radiale pour les reconstructions HiLo avec et sans correction des aberrations optiques induites par le cerveau, ainsi que pour l'image plein champ conventionnelle et pour la composante hautes fréquences (Hi) avec correction des aberrations de l'échantillon.

tique apportée par l'optique adaptative, la figure 3.22C présente le profil d'intensité, au niveau de la zone d'intérêt, des images HiLo reconstruites sans et avec correction des aberrations. L'optique adaptative a permis d'augmenter le contraste de la modulation (figure 3.21) et ainsi d'augmenter l'efficacité de collection des basses fréquences spatiales du plan de mise au point. Une quantification a également été réalisée dans le domaine spectral. La densité de puissance

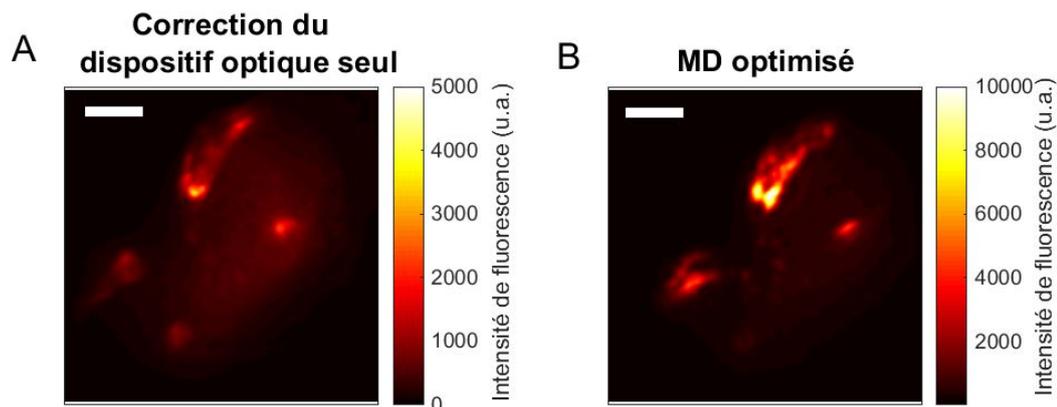


FIGURE 3.23 – Composante basses fréquences spatiales de l'image HiLo à 40  $\mu\text{m}$  de profondeur dans le cerveau de la drosophile. (A) Seules les aberrations du système optique sont corrigées. (B) Le miroir déformable optimise le facteur de mérite  $M_{TF}$ . Barre d'échelle : 30  $\mu\text{m}$ .

spectrale radiale a été calculée pour les images HiLo reconstruites avec et sans optique adaptative, ainsi que pour l'image prise en illumination uniforme avec optique adaptative, et pour la composante hautes fréquences spatiales de cette dernière. Ces spectres sont présentés à la figure 3.22D. Ils se superposent parfaitement en ce qui concerne l'information liée aux hautes fréquences. En revanche, l'information liée aux basses fréquences spatiales varie beaucoup. La comparaison des spectres des images plein champ (courbe jaune) et HiLo (courbe orange) avec correction d'aberrations montre que la reconstruction HiLo permet de diminuer la composante basses fréquences spatiales en s'affranchissant de celles qui ne sont pas dans le plan de mise au point. L'image HiLo reconstruite avec optique adaptative (courbe orange) présente plus de basses fréquences que celle obtenue en ne corrigeant que les aberrations du système optique (courbe bleue), ce qui est également observable sur les images présentées dans la figure 3.23. En effet, si les aberrations optiques ne sont pas corrigées à cette profondeur dans le cerveau de la drosophile, le motif d'illumination est dégradé et la reconstruction de la section optique n'est alors pas de bonne qualité dans le sens où, quantitativement, on perd de l'information basses fréquences spatiales du plan de mise au point.

## 3.5 Discussion et perspectives

### 3.5.1 Une “étoile guide” plein champ intrinsèquement liée à la microscopie à illumination structurée

Le but de l'ajout d'un dispositif d'optique adaptative est la correction des aberrations optiques en vue d'améliorer la qualité des images plein champ HiLo en profondeur dans le cerveau de la drosophile. Nous avons opté en première approche pour une correction des aberrations sans mesure de front d'onde. La correction des aberrations est alors basée sur l'optimisation d'un facteur de mérite qui reflète la qualité de l'image. En microscopie confocale, ou à balayage plus généralement, un critère souvent utilisé est la maximisation de l'intensité du signal de fluorescence détecté sur la caméra [139, 143, 144]. Mais dans le cas de la microscopie plein champ

dans un échantillon biologique, qui contient des structures à de multiples échelles, maximiser localement l'intensité détectée ne conduit pas nécessairement à l'amélioration de la qualité de l'image. Nous avons choisi d'utiliser la grille de modulation, "porteuse optique" de la microscopie HiLo, en tant qu'"étoile guide". Le facteur de mérite  $M_{TF}$ , défini dans l'équation 3.7, permet de mesurer l'intensité du signal détecté dans une zone de fréquences spatiales autour de la fréquence de modulation de la grille. Il reflète alors la qualité de l'image de la structure d'illumination projetée dans l'échantillon et est sensible à la quantité d'aberrations dans le front d'onde. En microscopie à illumination structurée, la qualité de la coupe optique dépend de la qualité finale du motif qui peut être dégradée sur le chemin d'excitation lors de la projection du motif par la matrice de micro-miroirs, mais également sur la voie d'émission lorsque l'on observe la grille en fluorescence. La valeur du facteur de mérite  $M_{TF}$  dépend de ces contributions et son utilisation permet alors d'optimiser le chemin complet de la matrice de micro-miroirs à la caméra. Pour parvenir à corriger simultanément les voies d'excitation et d'émission avec un seul élément correcteur (miroir déformable) celui-ci doit être placé à un endroit commun des voies d'excitation et d'émission (figure 5.1). L'absence d'aberrations différentielles significatives entre les voies d'excitation et d'émission a été vérifiée (figure 3.13). Celles-ci auraient limité l'efficacité de l'optimisation simultanée du chemin complet, qui aurait alors nécessité l'emploi de deux miroirs déformables.

#### 3.5.2 La base de projection des modes d'aberrations et les modes sélectionnés pour l'optimisation du front d'onde

La base de projection des modes d'aberrations, qui a été utilisée, est la base des polynômes de Zernike. Pour l'optimisation, on s'est restreint à l'utilisation des modes d'aberration de plus bas ordres à savoir :

- les aberrations du 3<sup>ème</sup> ordre : astigmatisme à 45°, astigmatisme à 0°, coma X, coma Y, trefoil 30°, trefoil 0°, aberration sphérique. Les basculements X et Y ainsi que la défocalisation n'ont pas été pris en compte,
- l'aberration sphérique du 5<sup>ème</sup> ordre.

En ajoutant l'ensemble des aberrations du 5<sup>ème</sup> ordre, l'amplitude de correction ne varie pas de plus de 10 nm RMS par rapport à la situation où on ne prend en compte que les aberrations du 3<sup>ème</sup> plus l'aberration sphérique du 5<sup>ème</sup> ordre. L'algorithme utilisé ( $3N$ ) repose sur la prise de trois images pour chaque mode d'aberration sélectionné pour l'optimisation qui sont au nombre de  $N$ . Pour optimiser le rapport efficacité/rapidité, nous n'avons gardé comme aberration du 5<sup>ème</sup> ordre que l'aberration sphérique, car expérimentalement nous avons constaté un rôle non négligeable de cette aberration dans nos échantillons. Une optimisation sur un nombre restreint d'aberrations mais participant effectivement à la dégradation du front d'onde permet de réaliser la correction d'aberration plus rapidement, afin de se rapprocher des contraintes de dynamique temporelle pour l'imagerie *in vivo*. Le second avantage est la diminution de l'exposition de l'échantillon réduisant ainsi les possibles effets de photoblanchiment des rapporteurs fluorescents et/ou de phototoxicité. Dans de nombreuses implantations de l'optique adaptative en microscopie, par exemple en microscopie confocale ou biphotonique

### Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

---

[143, 161], corriger uniquement l'aberration sphérique améliore déjà grandement la qualité des images. Mais, le cerveau de la drosophile est très complexe et présente des variations locales d'indice de réfraction. Il ne suffit donc pas de corriger juste l'épaisseur traversée en considérant uniquement un saut d'indice entre le milieu d'immersion et l'échantillon. Nous avons observé dans notre cas que l'aberration sphérique n'est pas l'aberration dominante, l'aberration de coma étant souvent supérieure. Dans toute l'étude présentée, nous ne nous sommes pas intéressés aux effets de la diffusion qui correspond à des aberrations d'ordres très élevés. Avec les 52 actuateurs du miroir déformable utilisé, on ne peut corriger que les aberrations de plus bas ordres et non la diffusion. Pour façonner le front d'onde à cet effet, il faudrait alors recourir par exemple à un modulateur spatial de lumière avec plus d'actionneurs [171]. Néanmoins, la diffusion ne semble pas être la principale source de dégradation des images puisque la boucle d'optique adaptative permet de préserver efficacement la qualité des images quelle que soit la profondeur dans l'échantillon, malgré le faible nombre d'aberrations corrigées.

La base de projection des modes d'aberrations, constituées des polynômes de Zernike, est orthogonale pour la décomposition du front d'onde. Mais notre approche ne se base pas sur la mesure du front d'onde d'un objet de référence. Nous ne pouvons donc pas assurer que la base des polynômes de Zernike est parfaitement orthogonale pour le facteur de mérite utilisé. Néanmoins, le système de microscopie développé est à pupille circulaire et les aberrations sélectionnées pour l'optimisation ne sont que les ordres les plus bas, ce qui a donc orienté notre choix vers les polynômes de Zernike. Comme nous n'utilisons pas une base de modes orthogonaux, nous ne pouvons pas assurer que l'algorithme d'optimisation converge toujours vers la même solution. Toutefois, expérimentalement, nous avons observé que pour un ensemble de modes d'aberrations à corriger donné, on aboutit toujours à la même forme de miroir finale (différence de formes de miroirs inférieure à 20 nm RMS), ce qui laisse supposer que notre base est "presque orthogonale" pour les aberrations de plus bas ordres. Une base orthogonale spécifique de notre facteur de mérite pourrait être développée [163, 172]. Cependant, il faudrait alors créer une base adaptée pour chacun des motifs que l'on serait amené à utiliser, de fréquence spatiale ou d'orientation différentes. En première approche, nous avons donc décidé d'utiliser la base de fonctions fournies avec le système commercial {Shack – Hartmann + miroir déformable}.

On peut remarquer, au vu des résultats exposés dans ce chapitre, que l'astigmatisme à 45° joue un rôle particulier dans notre expérience. En effet, à plusieurs reprises, cette aberration s'est distinguée des autres par les amplitudes de ses fluctuations : en comparant les résultats des optimisations réalisées avec les deux facteurs de mérite  $M_{\text{Sobel}}$  et  $M_{\text{TF}}$  (figure 3.14), en suivant l'évolution temporelle du front d'onde (figure 3.19) ainsi qu'en examinant le contenu en aberrations obtenu pour des optimisations avec deux fréquences spatiales de lignes différentes (figure 3.20). Le point commun entre toutes ces expériences est l'utilisation du facteur de mérite  $M_{\text{TF}}$ . Il est donc légitime de penser que la valeur de ce facteur de mérite est peu sensible à l'astigmatisme à 45°, ce qui correspondrait à une faible sensibilité pour des déformations dans la direction des lignes du motif d'illumination. Ainsi, la valeur de cette aberration ne permet pas d'améliorer la valeur du facteur de mérite et l'astigmatisme à 45° pourrait ne pas être pris

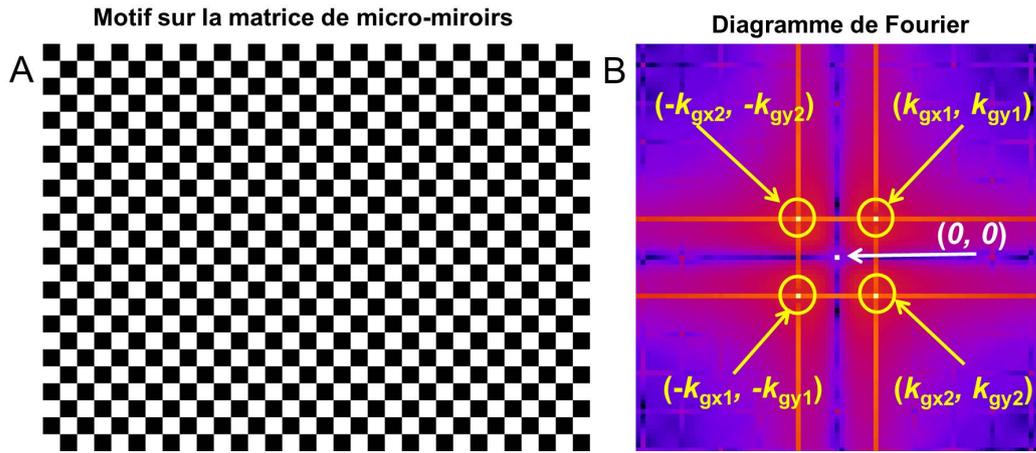


FIGURE 3.24 – Représentation dans les espaces spatial et fréquentiel d'un motif permettant une optimisation simultanée des deux types d'astigmatisme : astigmatisme à  $0^\circ$  et astigmatisme à  $45^\circ$ . (A) Motif binaire de commande de la matrice de micro-miroirs. (B) Transformée de Fourier de l'image présentée en (A). Les pics correspondant aux deux orientations orthogonales du motif d'illumination sont entourées par les ronds jaunes.

en compte dans l'optimisation car il est inutile de tenter de corriger cette aberration avec le facteur de mérite  $M_{TF}$  défini. De plus, cela augmenterait la dynamique temporelle de correction. Cependant, nous n'avons pas réalisé *a priori* que le facteur de mérite  $M_{TF}$  allait être aussi peu sensible à ce mode d'aberration. Deux solutions peuvent alors être envisagées profitant de la rapidité et la flexibilité de la matrice de micro-miroirs pour générer la modulation de l'illumination. La première solution consiste à utiliser un motif en damier (figure 3.24) afin de pouvoir corriger à la fois l'astigmatisme à  $0^\circ$  et l'astigmatisme à  $45^\circ$ . Cela nécessite toutefois de redéfinir un critère de mérite prenant en compte les deux pics de Dirac liés à l'orientation et à la fréquence du motif d'illumination :

$$M_{TF} = \left( \iint |G(k_x, k_y) \mathcal{F}(I)|^2 dk_x dk_y \right)^{-1}, \quad (3.12)$$

avec :

$$G(k_x, k_y) = \exp \left[ -\frac{(k_x - k_{gx1})^2 + (k_y - k_{gy1})^2}{w^2} \right] + \exp \left[ -\frac{(k_x - k_{gx2})^2 + (k_y - k_{gy2})^2}{w^2} \right], \quad (3.13)$$

où  $(k_{gx1}, k_{gy1})$  et  $(k_{gx2}, k_{gy2})$  correspondent aux coordonnées, dans l'espace fréquentiel, des pics de Dirac dus à la périodicité du motif d'illumination. Les autres notations ont déjà été détaillées dans la section 3.2.1.2. Une seconde solution consiste à optimiser successivement l'ensemble des aberrations, excepté l'astigmatisme à  $45^\circ$ , avec un motif de lignes, puis à pivoter le motif de  $90^\circ$  sur la matrice de micro-miroirs en n'optimisant alors que l'aberration manquante à savoir l'astigmatisme à  $45^\circ$ . Les deux approches d'optimisation présentées nécessitent *a priori* la prise du même nombre d'images ( $3N$ ). Pour la seconde approche, la différence principale est la nécessité de changer le motif sur la matrice de micro-miroirs mais le temps caractéristique pour effectuer ce changement est extrêmement faible, typiquement  $6 \mu s$  (figure 2.20 du Chapitre 2).

### 3.5.3 Zone isoplanétique de correction des aberrations

Un des paramètres essentiels qui caractérisent un système d'optique adaptative pour la microscopie plein champ est l'étendue de la zone isoplanétique de correction, c'est-à-dire l'étendue de la région de l'échantillon dans laquelle la correction améliore la qualité de l'image. Le critère de Maréchal [169] considère que la qualité optique reste satisfaisante pour des rapports de Strehl supérieurs à 0.8. Nous avons estimé l'étendue latérale de cette zone isoplanétique à environ  $40 \times 40 \mu\text{m}$  (figure 3.15). Ainsi, il est impossible de corriger l'intégralité du champ occupé par les corps pédonculés mais cette taille permet néanmoins de corriger séquentiellement les aberrations dans des sous-structures telles que le lobe  $\alpha$  ou les corps cellulaires des cellules de Kenyon. Cette approche peut être comparée à l'utilisation de billes fluorescentes servant d'"étoile guide" disséminées dans le champ de vue [157]. Néanmoins, notre démarche présente ces intérêts supplémentaires de ne pas être dépendante de la position de l'insertion des billes par rapport aux structures biologiques d'intérêt, et d'être moins invasive car notre "étoile guide", la structuration du motif d'illumination, est artificielle.

Dans la direction axiale, il est également possible de définir une zone d'isoplanétisme. Nos études ont montré que l'étendue axiale sur laquelle la correction se conserve est d'environ  $20 \mu\text{m}$  (figure 3.18). Ainsi, pour réaliser des coupes optiques de bonne qualité sur toute la profondeur imagée dans le cerveau avec un seul miroir déformable, les corrections doivent se faire séquentiellement à différentes profondeurs. Une piste envisageable est de faire ces différentes corrections en amont de l'imagerie, d'enregistrer la séquence de formes de miroirs déformables corrigeant l'ensemble de la profondeur, et ensuite de lancer cette séquence tout en imageant la structure d'intérêt sur toute la profondeur. Cette approche séquentielle d'optimisation puis d'imagerie est envisageable car les aberrations induites par l'échantillon évoluent peu dans le temps, au moins à l'échelle d'une heure (figure 3.19). L'étape d'optimisation pourrait également être réalisée en utilisant un marquage fluorescent spectralement différent du marquage d'intérêt pour les expériences. Cette stratégie de marquage bi-couleur des neurones des drosophiles a été employée dans les expériences qui seront présentées dans le Chapitre 4, où un marquage fluorescent rouge des noyaux des neurones des corps pédonculés sert uniquement de repère, et un marquage vert correspond à la sonde fonctionnelle d'intérêt, à savoir la sonde calcique G-CaMP6f ou la sonde voltage ArcLight. Cette même stratégie pourrait être mise à profit ici afin de ne pas photoblanchir le marquage fluorescent d'intérêt.

Dans le cadre de l'astronomie, une approche d'optique adaptative multi-conjuguée a été mise au point pour résoudre un problème d'aberrations différentes à différentes altitudes [173]. La dénomination "multi-conjuguée" vient du fait que plusieurs miroirs déformables sont conjugués chacun d'une altitude particulière. Elle a ensuite été appliquée à la microscopie [174] pour corriger des aberrations dans des plans conjugués de différents miroirs déformables. Cette configuration n'est pas applicable avec notre approche d'optimisation basée sur un facteur de mérite. Hormis le fait que l'optique adaptative multi-conjuguée nécessite l'utilisation d'un nombre de miroirs déformables égal au nombre de positions différentes en profondeur que l'on souhaite corriger (environ 4 dans notre cas pour effectuer une correction tous les  $20 \mu\text{m}$  sur  $80 \mu\text{m}$  de profondeur), nous ne pouvons pas appliquer cette méthode car notre "étoile guide" est la modulation de l'illumination et ne peut donc pas être simultanément présente

dans différentes régions axiales éloignées d'une épaisseur de tissu de  $20 \mu\text{m}$ . En effet, cette modulation n'est visible que sur une faible épaisseur et c'est cette caractéristique qui confère la capacité de sectionnement optique à la microscopie HiLo.

Les résultats, qui sont présentés dans cette thèse, ont été obtenus à des profondeurs d'imagerie jusqu'à  $50 \mu\text{m}$  dans le cerveau de la drosophile, en utilisant un motif d'illumination de fréquence spatiale environ égale à  $0.2f_0$  où  $f_0$  est la fréquence de coupure du système d'imagerie. L'inconvénient est que les projections axonales formant le lobe  $\gamma$  se trouvent à environ  $80 \mu\text{m}$  de profondeur. Or, cette structure présente également un grand intérêt car il a été démontré qu'elle est impliquée notamment dans la restitution de la mémoire à court terme. Cependant, le motif de fréquence spatiale  $0.2f_0$  étant absolument indiscernable à cette profondeur dans le cerveau, il est alors impossible d'optimiser le facteur de mérite en débutant uniquement sur du bruit. Afin de rendre possible une optimisation à  $80 \mu\text{m}$  de profondeur sur une grille d'une telle fréquence spatiale, une idée est donc d'optimiser le front d'onde préalablement en utilisant une grille de fréquence spatiale plus petite puis d'utiliser cette correction pour optimiser le front avec la grille de fréquence spatiale  $0.2f_0$ . Cette approche devrait être possible car il y a peu d'aberrations différentielles pour l'optimisation des différentes fréquences spatiales, du moins pour les deux motifs qui ont été testés (figure 3.20).

#### 3.5.4 Perspectives : Correction avec "étoile guide" générée par excitation biphotonique et imagerie par microscopie HiLo à un photon

Comme nous l'avons vu précédemment, la correction des aberrations optiques de l'ensemble du volume occupé par les corps pédonculés, soit environ  $150 \times 100 \times 80 \mu\text{m}^3$ , nécessite l'optimisation séquentielle de différentes sous régions dans le champ de la caméra mais également en profondeur. La correction de  $N$  aberrations dans chacune de ces zones nécessite  $3N$  images. Cette technique nécessite donc l'illumination de l'échantillon durant toute cette phase de correction qui peut être longue. Dans nos expériences, nous avons utilisé typiquement des durées d'exposition de 100 ms par image. La correction de 8 modes dans 4 plans et 4 zones du champ nécessite donc la prise de près de 400 images pour une durée d'exposition de l'ordre d'une minute. Une solution pour réduire fortement cette durée est alors d'introduire un moyen de corriger les aberrations en utilisant le mesureur de front d'onde qui permet, en boucle fermée (figure 3.7), de converger beaucoup plus rapidement vers la forme de miroir optimisant le front d'onde [175, 176]. Cette approche permettra certes d'accroître la rapidité de la correction, mais elle ne nous dispensera pas de devoir séquentiellement corriger les aberrations dans différents sous-volumes de l'échantillon. Cette technique nécessite comme expliqué dans la section 3.1.3.3, la présence de points sources dans l'échantillon. L'insertion à des positions précises de billes fluorescentes étant extrêmement délicate, et l'impact de l'insertion de ces billes sur le fonctionnement cérébral normal de la drosophile étant peu connu, il est plus judicieux de créer des étoiles artificielles par excitation biphotonique du marquage fluorescent. Cette approche s'apparente à la méthode employée en astronomie où pour compenser le très faible nombre d'étoiles suffisamment brillantes pour être utilisées comme "étoiles guides", on

### Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

---

en fabrique artificiellement en excitant des atomes de sodium dans la mésosphère à l'aide d'un laser émettant à 589 nm. La microscopie biphotonique est utilisée en routine pour l'imagerie *in vivo* du cerveau de la drosophile [177, 178] et il est donc cohérent d'utiliser ce signal pour la correction des aberrations. Il faut toutefois noter que le but n'est pas de faire de la microscopie biphotonique corrigée en aberration, ce qui a déjà été développée avec succès. L'idée est de combiner la rapidité potentielle de correction des aberrations en utilisant une mesure du front d'onde provenant des "étoiles guides" générées par excitation biphotonique, avec un laser titane-saphir en mode impulsionnel, tout en conservant la modalité d'imagerie plein champ à illumination structurée HiLo. Cette configuration permettrait de faire avancer en parallèle la boucle d'optimisation et l'imagerie car la correction des aberrations par ce biais n'utilise pas la prise d'image par la caméra. Afin de corriger tridimensionnellement les aberrations optiques dégradant l'imagerie des corps pédonculés, il faudra générer séquentiellement différentes "étoiles guides" biphotoniques en utilisant par exemple des miroirs galvanométriques, puis optimiser le front d'onde au niveau de ces différents points source. L'enjeu consiste ensuite à recréer une image composite en associant les différentes zones corrigées sur chacune des images. Cette reconstruction peut se complexifier du fait de la présence de mouvements résiduels du cerveau de la drosophile malgré la présence du gel d'agarose. Les perspectives sont nombreuses pour cette étude : la correction des aberrations utilisant le signal de fluorescence excité à deux photons étant indépendante de l'imagerie, il est possible en utilisant un double marquage fluorescent de faire la correction en utilisant l'un des marqueurs fluorescents, puis de réaliser les études biologiques grâce au second rapporteur fluorescent. Le choix des caractéristiques spectrales de ces deux marqueurs est dicté par la gamme d'accordabilité du laser femtoseconde utilisé. Une autre possibilité que l'excitation biphotonique pour créer des points sources servant de mesure de référence de front d'onde est de tirer parti des outils génétiques disponibles chez la drosophile. On peut marquer par exemple des neurones individuels ou des sous-compartiments cellulaires avec des pilotes d'expression GAL4 qui restreignent fortement le nombre de cellules marquées. Une limitation résiduelle concerne la position de ces "étoiles guides" qui doivent être proches des zones d'intérêt à corriger des aberrations.

## 3.6 Conclusion

Dans ce chapitre, j'ai présenté l'incorporation d'un système d'optique adaptative pour restaurer les performances de la microscopie à illumination structurée HiLo en profondeur dans le cerveau de la drosophile. Des coupes optiques HiLo ont pu être réalisées *in vivo* jusqu'à 50  $\mu\text{m}$  de profondeur en utilisant un motif de fréquence spatiale typique de  $0.2f_0$ . L'optimisation du front d'onde aberrant a été réalisée sans mesure de celui-ci mais en se basant sur la valeur d'un facteur de mérite décrivant au mieux la qualité de l'image. Dans notre cas, nous avons choisi de baser le calcul de notre facteur de mérite sur l'énergie contenue dans les pics créés par la modulation de l'illumination dans l'espace de Fourier. Cette technique s'est révélée efficace pour la correction des modes d'aberration les plus bas dans la base des polynômes de Zernike.

Tous les microscopes optiques étant concernés par les aberrations optiques, l'optique

### Chapitre 3. Optique adaptative pour l'imagerie plein champ HiLo du cerveau de la drosophile en profondeur

---

adaptative représente un grand potentiel pour l'imagerie de haute qualité, de plus en plus en profondeur dans des échantillons épais. Cette technologie peut aussi bien être implantée pour des microscopies limitées par la diffraction tels que les microscopes plein champ, confocaux ou biphotoniques ou pour des microscopes de superrésolution. Un des apports majeurs de l'optique adaptative pour l'imagerie *in vivo* est la possibilité d'obtenir des images de meilleur contraste par correction des aberrations, tout en utilisant des intensités d'excitation plus basses. Ce paramètre est très important pour assurer la viabilité de l'échantillon vivant étudié. Il faut toutefois noter que les aberrations optiques peuvent parfois être utilisées à des fins constructives. Par exemple, celles-ci peuvent être introduites volontairement pour réaliser des coupes optiques par soustraction d'une image aberrante et d'une image non aberrante [179, 180]. L'ajout d'astigmatisme peut également servir à encoder avec une grande précision la position axiale pour la microscopie de superrésolution tridimensionnelle. [181].

# 4

## Microscopie multicon focale pour l'imagerie massive *in vivo* du centre de la mémorisation de la drosophile à l'échelle du neurone individuel

### Sommaire

---

4.1	Introduction : Objectif du projet . . . . .	122
4.2	Matériel et méthodes . . . . .	123
4.2.1	Le dispositif d'imagerie multicon focale à deux couleurs . . . . .	123
4.2.1.1	L'imagerie multicon focale "spinning disk" . . . . .	123
4.2.1.2	Résultats préliminaires de microscopie multicon focale obtenus à l'Institut Curie . . . . .	124
4.2.1.3	Le dispositif de microscopie "spinning disk" . . . . .	125
4.2.1.4	Le système DualView . . . . .	127
4.2.1.5	Performances optiques du microscope . . . . .	127
4.2.2	Le système de stimulation . . . . .	130
4.2.2.1	La cellule environnementale . . . . .	130
4.2.2.2	Le dispositif de stimulation olfactive . . . . .	131
4.2.2.3	Le dispositif de stimulation électrique . . . . .	132
4.2.2.4	La synchronisation de l'imagerie et des stimuli . . . . .	133
4.2.3	Les lignées de drosophiles . . . . .	135
4.2.3.1	Le marquage bi-couleur . . . . .	135
4.2.3.2	Préparation de la drosophile . . . . .	135
4.2.3.3	Test pharmacologique de l'état de forme de la drosophile pour les études fonctionnelles . . . . .	136

## Chapitre 4. Microscopie multicon focale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

---

4.3	Imagerie des corps cellulaires et difficultés rencontrées . . . . .	138
4.3.1	Imagerie 5D ( $X, Y, Z, t, \lambda$ ) des corps cellulaires . . . . .	138
4.3.1.1	Imagerie "mCherry/ArcLight" . . . . .	138
4.3.1.2	Imagerie "mCherry/G-CaMP6f" . . . . .	140
4.3.2	Anisotropie de résolution . . . . .	140
4.3.3	Imagerie bi-couleur et mouvement . . . . .	141
4.3.4	Extension axiale des corps cellulaires des cellules de Kenyon et imagerie 3D . . . . .	142
4.3.5	Photoblanchiment des sondes fluorescentes . . . . .	143
4.4	Imagerie fonctionnelle des corps cellulaires et analyse globale . . . . .	145
4.4.1	Réponse à des stimulations électriques dans les corps cellulaires des cellules de Kenyon . . . . .	146
4.4.2	Réponse à des stimulations olfactives dans les corps cellulaires des cellules de Kenyon . . . . .	147
4.5	Analyse à l'échelle du neurone individuel par bioinformatique . . . . .	149
4.5.1	Compensation du mouvement . . . . .	149
4.5.2	Procédé de détection des corps cellulaires individuels . . . . .	150
4.5.2.1	Première version : Algorithme de seuillage sur l'intensité . . . . .	151
4.5.2.2	Deuxième version : Algorithme de détection de la forme . . . . .	152
4.5.3	Suivi temporel des noyaux . . . . .	154
4.5.4	Test de l'algorithme de détection sur image synthétique . . . . .	155
4.5.5	Perspectives : Quantification du signal du rapporteur fluorescent d'activité neuronale à l'échelle du neurone individuel . . . . .	156
4.6	Discussion . . . . .	157
4.6.1	Imagerie tridimensionnelle <i>in vivo</i> d'un réseau neuronal entier, résolue à l'échelle du neurone individuel . . . . .	157
4.6.2	L'imagerie de fluorescence multicon focale et la profondeur . . . . .	158
4.6.3	Algorithme de traitement des images dédié à l'imagerie du réseau mnésique	161
4.7	Conclusion . . . . .	162

---

### 4.1 Introduction : Objectif du projet

Malgré des avancées en neurobiologie, la formation d'un souvenir est loin d'être totalement comprise. La principale barrière pour interpréter le code neuronal impliqué lors de la mémorisation est la capacité de suivre l'activité globale du réseau de neurones à l'échelle cellulaire. L'objet de ce chapitre est le regroupement de trois compétences -neurosciences, microscopie optique et analyse quantitative d'images- afin de développer les outils nécessaires à l'analyse en trois dimensions et au cours du temps du centre de la mémoire, à l'échelle du neurone individuel, au cours d'un événement de mémorisation. Le modèle de la drosophile est particulièrement adapté à cette étude. Le centre de la mémorisation, lié à un protocole d'apprentissage associatif olfactif, a été identifié chez la drosophile [3] : il s'agit des corps

## Chapitre 4. Microscopie multiconfocale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

---

pédonculés composés de neurones appelés cellules de Kenyon. Ces neurones sont le point de convergence de l'information olfactive et des signaux de nourriture ou des chocs électriques utilisés lors des expériences de conditionnement [182] (respectivement dans le cas de protocoles appétitif ou aversif). Pour une molécule odorante donnée, les informations olfactives en provenance des lobes antennaires n'activent qu'une très faible population de cellules de Kenyon [27, 183, 184]. Cette réponse est non stéréotypique c'est-à-dire que la position des cellules de Kenyon qui répondent à une odeur donnée est différente entre les individus [185]. En revanche, les informations codant le contexte (appétitif ou aversif) ont un effet beaucoup plus global sur les neurones des corps pédonculés. Le codage de la mémoire ne se fera que dans les neurones ayant associés ces deux stimulations. Il est donc important de pouvoir suivre l'activité de ces neurones de façon individuelle au cours de la formation de la mémoire olfactive.

Les approches optiques dans le domaine de la neurobiologie de la drosophile sont principalement la microscopie confocale ou la microscopie biphotonique. Néanmoins, ces techniques ne sont pas assez rapides pour suivre en temps réel l'activité de l'ensemble des cellules de Kenyon. Pour ce projet, j'ai alors utilisé une microscopie basée sur la technologie "spinning disk" qui permet de paralléliser l'imagerie confocale et ainsi d'augmenter d'un facteur environ dix la rapidité d'imagerie, en comparaison d'un microscope confocal à balayage traditionnel [186].

## 4.2 Matériel et méthodes

### 4.2.1 Le dispositif d'imagerie multiconfocale à deux couleurs

#### 4.2.1.1 L'imagerie multiconfocale "spinning disk"

En microscopie confocale traditionnelle, l'acquisition se fait en excitant point par point l'échantillon. Cette technique d'imagerie est alors limitée par la vitesse de balayage latéral du faisceau d'excitation, réalisé soit à l'aide de cales piezo-électriques, soit de miroirs galvanométriques. Néanmoins, même pour des techniques de microscopie confocale, où la dynamique du balayage est optimisée grâce à l'utilisation de déplacements non mécaniques assurés par exemple par des défecteurs acousto-optiques [89, 187], la vitesse de balayage est limitée par la brillance de l'échantillon. En effet, pour réaliser de la microscopie confocale rapide, le temps passé par pixel doit être très faible, imposant une grande puissance d'excitation afin de récolter suffisamment de photons de fluorescence. Cette caractéristique est une limitation pour l'imagerie *in vivo* où l'échantillon doit être préservé au maximum des effets délétères d'une trop forte excitation lumineuse. De plus en microscopie confocale, la durée d'acquisition d'une image dépend grandement de sa taille. Des valeurs typiques de durées d'exposition minimales en fonction de la taille de l'image, pour le microscope confocal que j'ai utilisé durant ma thèse (Olympus Fluoview FV1000), sont données dans le tableau 4.1. Ces durées ne sont pas adaptées à l'imagerie tridimensionnelle rapide d'un système vivant comme le nécessite notre étude. La microscopie multiconfocale permet de paralléliser le faisceau d'excitation pour augmenter la dynamique temporelle d'imagerie. Son principe de fonctionnement est décrit dans la section 2.1.3.2 du Chapitre 2. Les caractéristiques précises du modèle de microscope multiconfocal utilisé durant

## Chapitre 4. Microscopie multiconfocale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

cette thèse seront détaillées dans la section 4.2.1.3.

Taille de l'image (pixels)	Durée d'acquisition minimale (ms)
128×128	188
512×512	1109

Tableau 4.1 – Tableau récapitulatif de la durée d'exposition minimale pour différentes tailles d'images avec le microscope confocal Olympus Fluoview FV1000.

### 4.2.1.2 Résultats préliminaires de microscopie multiconfocale obtenus à l'Institut Curie

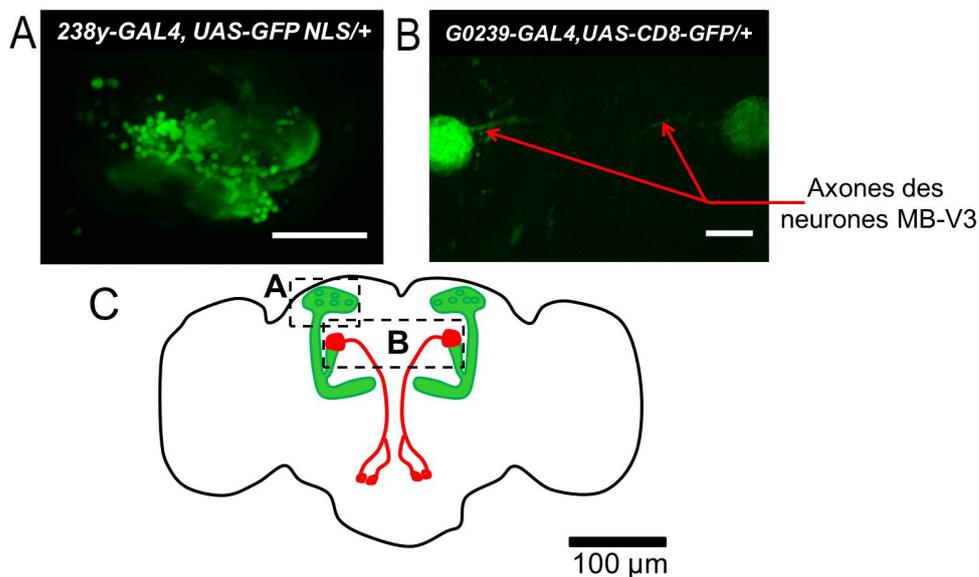


FIGURE 4.1 – Images réalisées sur un microscope “spinning disk” sur la plate-forme d'imagerie de l'Institut Curie avec la collaboration d'Olivier Renaud. (A) Projection maximale d'intensité, sur une épaisseur d'échantillon de 50 μm, de 50 images prises dans la zone des corps cellulaires des cellules de Kenyon, pour une drosophile de génotype *238y-GAL4, UAS-GFP NLS/+*. Barre d'échelle : 20 μm. (B) Projection maximale d'intensité, sur une épaisseur d'échantillon de 50 μm, de 50 images des neurones MB-V3, pour une drosophile de génotype *G0239-GAL4, UAS-CD8-GFP/+*. Barre d'échelle : 10 μm. Pour (A) et (B), la durée d'exposition est 65 ms. Le grandissement de l'objectif est 63× (Zeiss 63× ON 1.0 Vis-IR W plan apochromat 421480-9900). (C) Représentation anatomique schématique du cerveau de la drosophile. En vert sont représentés les corps pédonculés où la protéine fluorescente GFP est exprimée grâce au pilote d'expression *238y-GAL4*. Les neurones MB-V3, révélés par le pilote d'expression *G0239-GAL4*, sont représentés en rouge. Ces neurones projettent sur le lobe α des corps pédonculés. Les zones imagées en (A) et (B) sont également indiquées.

## Chapitre 4. Microscopie multiconfocale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

---

Des tests préliminaires de faisabilité ont été réalisés sur un dispositif de microscopie multiconfocale de type “spinning disk”, modèle Zeiss Examiner Axio, de la plate-forme d'imagerie de l'Institut Curie. Ce microscope est équipé d'un capteur CCD CoolSnap HQ2. Deux lignées transgéniques de drosophiles exprimant la protéine fluorescente GFP ont alors été imagées : *238y-GAL4, UAS-GFP NLS/+* et *G0239-GAL4, UAS-CD8-GFP/+*. La GFP NLS est exprimée dans les noyaux tandis que la CD8-GFP s'exprime dans le cytoplasme. Le pilote d'expression *238y-GAL4*, correspondant au marquage de l'ensemble des cellules de Kenyon, a été utilisé pour juger la qualité de l'imagerie des corps cellulaires des neurones des corps pédonculés. Le pilote d'expression *G0239-GAL4* permet quant à lui l'expression du rapporteur protéique CD8-GFP dans seulement deux paires de neurones par hémisphère du cerveau. Ce pilote d'expression est alors utilisé pour évaluer la sensibilité et la résolution *in vivo* du microscope car il permet de marquer des axones isolés, dont le diamètre est inférieur à la limite de diffraction. Il permet le marquage des neurones MB-V3 [188] dont les dendrites communiquent avec les lobes verticaux des corps pédonculés. Ces neurones jouent un rôle dans la formation de la mémoire à long terme chez la drosophile [189, 190]. La figure 4.1 montre les images obtenues avec le dispositif de l'Institut Curie. Les noyaux des corps cellulaires des cellules de Kenyon ainsi que les neurones MB-V3 ont pu être imagés jusqu'à une profondeur de 50  $\mu\text{m}$  dans le cerveau de la drosophile.

### 4.2.1.3 Le dispositif de microscopie “spinning disk”

Le microscope “spinning disk” utilisé précédemment pour les tests préliminaires l'a été sur plate-forme d'imagerie. Les contraintes matérielles de notre expérience -disponibilité des spécimens biologiques *in vivo*, adaptation permanente au microscope d'un système de stimulation olfactive et électrique- ne permettent pas un travail aisé au sein d'une plate-forme. Une schématisation du microscope “spinning disk”, que l'équipe de T. Préat a acquis suite aux tests réalisés à l'Institut Curie, et que j'ai utilisé pour obtenir les résultats présentés dans ce chapitre, est donnée à la figure 4.2. Il s'agit d'un microscope “spinning disk droit”, Zeiss Examiner Z1 Axio, équipé d'un capteur EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device, Photometrics Delta Evolve). L'excitation lumineuse est réalisée par deux lasers pompés par diode émettant aux longueurs d'onde de 491 nm et 561 nm (puissance maximale de 50 mW, Roper Scientific). Le balayage de l'échantillon est assuré grâce à une tête confocale de type CSUX1-M1N-E, dont le détail est précisé à la figure 4.2C. Ce disque de Nipkow, constitué d'un arrangement en spirale de 20000 trous de filtrage de diamètre 50  $\mu\text{m}$  espacés les uns des autres de 250  $\mu\text{m}$ , tourne au maximum à une vitesse de 5000 tours par minute de façon synchrone avec un second disque constitué du même nombre de micro-lentilles de diamètre 250  $\mu\text{m}$ . Lorsque les disques sont en rotation, environ 1000 faisceaux laser scannent simultanément l'échantillon. Cette parallélisation des faisceaux laser de balayage augmente alors la rapidité d'imagerie. La fréquence d'imagerie par plan est limitée à 60 Hz, limite imposée par la vitesse de rotation du disque. Un ensemble de filtres optiques interférentiels (modèle 59022 ET - EGFP/mCherry, Chroma) définissent les différentes voies spectrales du microscope. Chacun des filtres est constitué de deux bandes de transmission comme représenté sur la figure 4.3. La lame dichroïque permet de réfléchir la lumière excitatrice vers l'échantillon et de transmettre la fluorescence émise vers la caméra. Deux objectifs de microscope à immersion à eau sont disponibles sur ce dispositif :

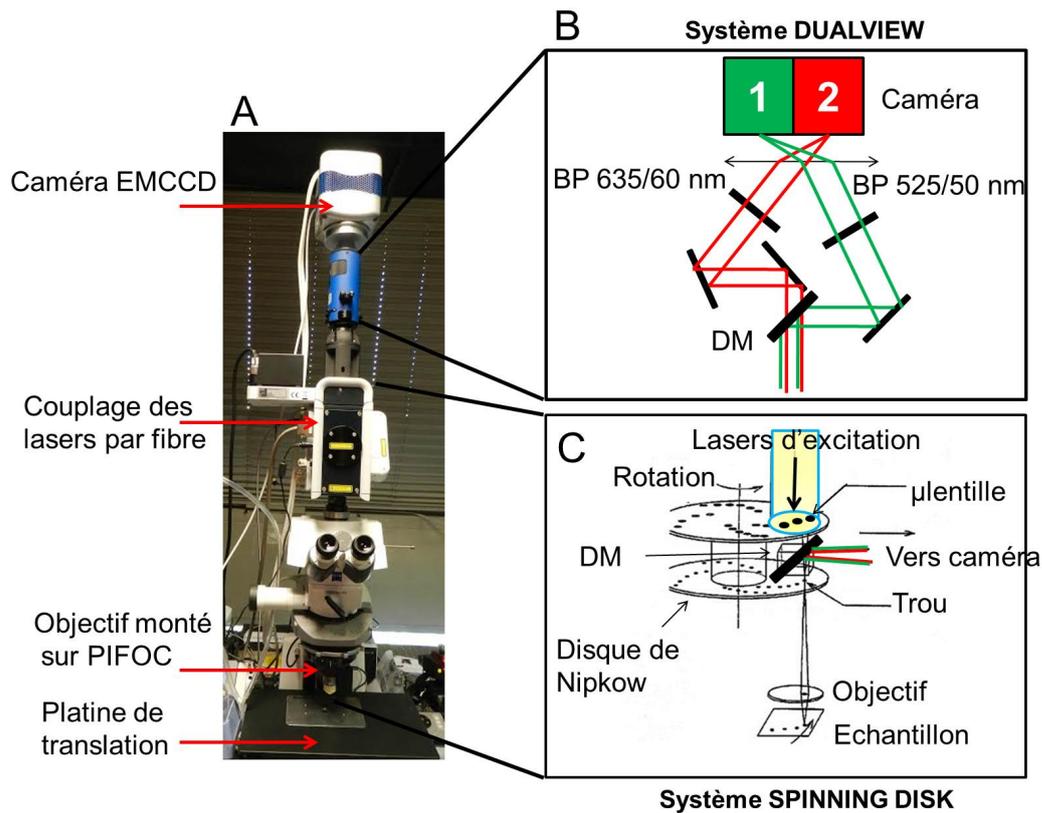


FIGURE 4.2 – (A) Photographie du système d'imagerie "spinning disk" Zeiss Examiner Z1 Axio. (B) Détail du système Dualview d'imagerie simultanée de deux longueurs d'onde d'émission séparées spectralement. BP : filtre à bande passante. (C) Détail de la tête multiconfocale pour le balayage de l'échantillon à l'aide de la rotation de disques de Nipkow. DM : miroir dichroïque.

Zeiss 40× ON 1.0 Vis-IR W plan apochromat 421462-9900 (distance de travail : 2.5 mm) et Zeiss 63× ON 1.0 Vis-IR W plan apochromat 421480-9900 (distance de travail : 2.1 mm). Ces objectifs ont une transmission de l'ordre de 80%, de 400 à 900 nm. Ils sont montés sur une cale piezo-électrique de course 100  $\mu\text{m}$  (Pifoc P-721.SL2, PI) permettant une translation axiale fine de l'objectif, de résolution 5 nm, et l'acquisition rapide de piles d'images en profondeur dans l'échantillon. La fréquence de résonance du Pifoc chargé à 200 g est de 180 Hz. La cadence maximale d'acquisition de 60 Hz n'entre pas en résonance avec celle de la cale piezo-électrique. Le porte-échantillon est monté sur une platine de translation afin d'ajuster sa position latéralement. Un ensemble de miroirs et de filtres (Dualview Photometrics DV2) est monté sur la voie d'émission du microscope, en amont de la caméra, afin de permettre l'acquisition simultanée au niveau de la caméra de deux longueurs d'onde. L'ensemble du système est piloté par le logiciel VisiView 2.1.3 (Visitron Systems GmbH) permettant par exemple le contrôle aisé de la durée d'exposition ou du gain de la caméra, l'acquisition multidimensionnelle des images (multispectrales et en fonction du temps) ainsi que l'écriture de macros pour le pilotage de matériels annexes au microscope par signaux logiques.

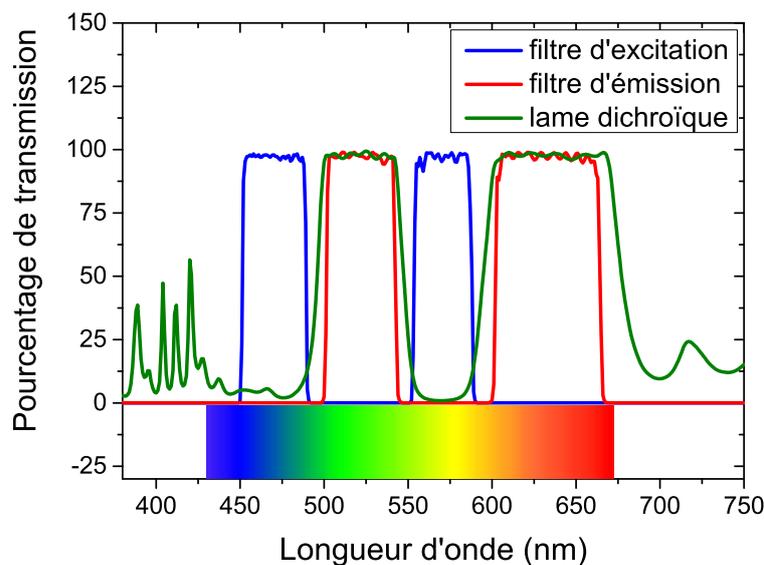


FIGURE 4.3 – Spectres de transmission des filtres d’excitation, d’émission et de la lame dichroïque utilisés dans le microscope “spinning disk” Zeiss. Ces trois filtres proviennent de la société Chroma. Le filtre d’excitation (modèle 59022x) transmet deux bandes spectrales de 450 à 490 nm (rayonnements de couleur bleue) et de 550 à 590 nm (rayonnements de couleur jaune). Le filtre d’émission (59022m) bloque la lumière excitatrice et transmet les bandes 500-550 nm (radiations vertes) et 605-665 nm (radiations rouges). La lame dichroïque, située au niveau des disques de Nipkow permet de séparer spectralement l’excitation de l’émission grâce à un design de transmission à deux bandes 500-540 nm (radiations vertes) et 600-670 nm (radiations rouges). Une portion du spectre de la lumière blanche est donné à titre indicatif.

### 4.2.1.4 Le système DualView

Ce dispositif (Dualview Photometrics DV2) est détaillé sur la figure 4.2B. Ce système permet d’imager, dans deux bandes spectrales disjointes, un même objet fluorescent. Son principe de fonctionnement est basé sur la séparation spatiale, à l’aide de miroirs et d’une lame dichroïque, des deux bandes d’émission. La lame dichroïque réfléchit la composante de l’émission de plus basse longueur d’onde, autour de 520 nm, tandis que la composante de l’émission de plus haute longueur d’onde, vers 610 nm, est transmise. Chaque composante spectrale est ensuite imagée simultanément sur une moitié du capteur EMCCD.

### 4.2.1.5 Performances optiques du microscope

Afin de déterminer les résolutions latérales et axiales du microscope multiconfocal, j’ai imagé des échantillons de billes fluorescentes de 100 nm de diamètre (Fluosphere, F8803), de longueur d’onde d’excitation 505 nm, et d’émission 515 nm, contenues dans un gel d’agarose polymérisé de concentration massique 2%. La figure 4.4 montre les coupes latérales et axiales de l’image d’une bille de 100 nm pour les deux objectifs de microscope différents. On retrouve l’anisotropie de résolution entre les directions latérales et axiales. On note également que

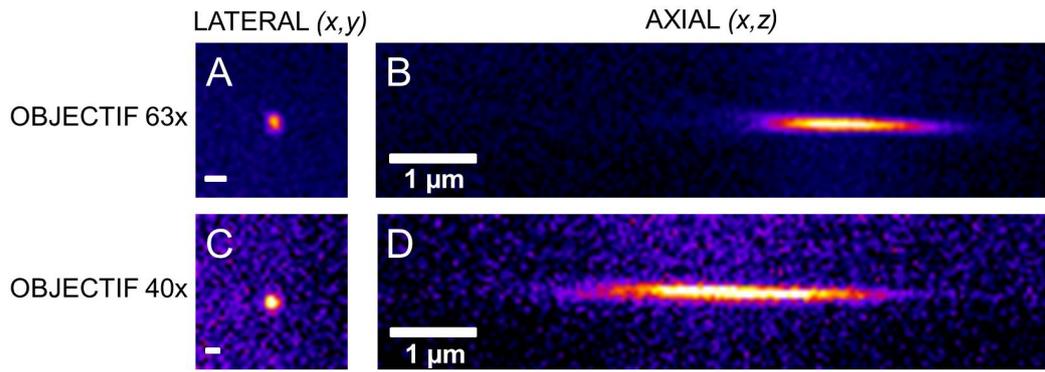


FIGURE 4.4 – Imagerie multiconfocale d'une bille fluorescente verte de 100 nm de diamètre dans un gel d'agarose de concentration massique 2% avec deux objectifs différents : Zeiss 63× *ON* 1 et Zeiss 40× *ON* 1. (A) Coupe latérale ( $x, y$ ) avec l'objectif Zeiss 63× *ON* 1. Barre d'échelle : 500 nm. (B) Reconstruction axiale ( $x, z$ ) avec l'objectif Zeiss 63× *ON* 1. Barre d'échelle : 1  $\mu\text{m}$ . (C) Coupe latérale ( $x, y$ ) avec l'objectif Zeiss 40× *ON* 1. Barre d'échelle : 500 nm. (D) Reconstruction axiale ( $x, z$ ) avec l'objectif Zeiss 40× *ON* 1. Barre d'échelle : 1  $\mu\text{m}$ .

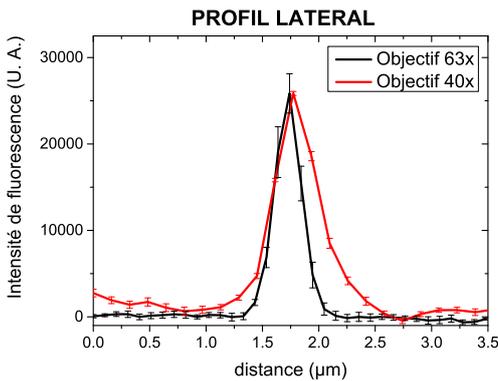


FIGURE 4.5 – Profils latéraux d'intensité de fluorescence pour les deux objectifs de microscope.  $n = 5$  billes fluorescentes de 100 nm.

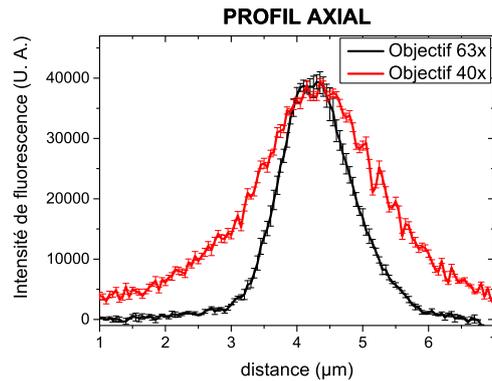


FIGURE 4.6 – Profils axiaux d'intensité de fluorescence pour les deux objectifs de microscope.  $n = 5$  billes fluorescentes de 100 nm.

les résolutions latérales et axiales sont affectées par l'objectif utilisé. Afin de quantifier ces résolutions, des profils d'intensité de fluorescence latéraux et axiaux moyennés sur 5 billes fluorescentes ont été tracés pour les deux objectifs (figures 4.5 et 4.6).

En modélisant la figure d'Airy par une fonction gaussienne et en appliquant la formule 2.20 du Chapitre 2 reliant la largeur à mi-hauteur *FWHM* de la modélisation gaussienne à la résolution spatiale, on obtient les résultats résumés dans le tableau 4.2. Les valeurs théoriques ont été déterminées en utilisant les équations 2.16 et 2.17 du Chapitre 2. On trouve expérimentalement des résolutions latérales de  $218 \pm 13$  nm et  $450 \pm 13$  nm respectivement pour les

## Chapitre 4. Microscopie multiconfocale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

	objectif 63× <i>ON</i> 1	objectif 40× <i>ON</i> 1	théorie <i>ON</i> 1
<i>taille d'un pixel</i>	102 nm	161 nm	
$FWHM_{x,y}$	<b>270 ± 10 nm</b>	<b>450 ± 10 nm</b>	
$FWHM_{x,y}$ déconvoluée	170 ± 10 nm	350 ± 10 nm	
$\Delta_{x,y}$	218 ± 13 nm	450 ± 13 nm	315 nm
$FWHM_z$	<b>1.3 ± 0.1 μm</b>	<b>2.2 ± 0.1 μm</b>	
$FWHM_z$ déconvoluée	1.2 ± 0.1 μm	2.1 ± 0.1 μm	
$\Delta_z$	1.5 ± 0.1 μm	2.7 ± 0.1 μm	1.4 μm

Tableau 4.2 – Tableau récapitulatif des largeurs à mi-hauteur latérales et axiales  $FWHM_{x,y}$  et  $FWHM_z$  des modélisations gaussiennes de la fonction d’Airy et comparatif des résolutions latérales  $\Delta_{x,y}$  et axiales  $\Delta_z$  expérimentales et théoriques pour les deux objectifs utilisés. Les valeurs en gras sont des déterminations expérimentales.

objectifs de grandissement 63× et 40×. Les mesures expérimentales de la résolution latérale sont plutôt en accord avec la valeur théorique, qui est de 315 nm. On constate néanmoins que l’on obtient une résolution latérale expérimentale plus petite que la valeur théorique pour l’objectif de grandissement 63×. Cet effet est probablement dû à un artefact d’échantillonnage. Le critère de Shannon-Nyquist impose un échantillonnage à une fréquence spatiale au moins double de celle de la limite de diffraction, soit environ deux pixels pour la largeur à mi-hauteur, ce qui est tout juste satisfait ici. On peut également remarquer que l’on obtient des résolutions axiales différentes pour les deux objectifs bien qu’ils aient la même ouverture numérique qui est le seul paramètre de l’objectif qui intervient dans le calcul théorique de la résolution axiale. Pour l’objectif 63×, la valeur expérimentale mesurée pour la résolution axiale  $\Delta_z$  est proche la valeur théorique où c’est le phénomène de diffraction qui limite la résolution spatiale. Pour l’objectif 40×, la résolution axiale correspond au double de la valeur théorique. On peut toutefois noter que les valeurs théoriques ne s’appliquent que si l’on considère un système optique sans aberration. Une dégradation de la résolution expérimentale par rapport aux valeurs théoriques peut être due par exemple à un mauvais remplissage de la pupille de l’objectif. En considérant la formule 2.17 et la valeur expérimentale  $\Delta_z$  mesurée pour l’objectif 40×, il est possible de calculer l’ouverture numérique *ON* effectivement utilisée pour l’imagerie. Le calcul donne une valeur de 0.8 pour l’ouverture numérique effective de l’objectif 40× utilisé sur ce système optique. Une autre hypothèse, plus plausible dans notre cas, expliquant la dégradation de la résolution spatiale par rapport à la limite de diffraction, est l’utilisation d’un seul et même disque de Nipkow avec une taille de trous fixe pour les deux objectifs. La taille des trous confocaux du disque est alors parfaitement adaptée à l’objectif de grandissement 63× et non à celui de grandissement 40×.

## 4.2.2 Le système de stimulation

### 4.2.2.1 La cellule environnementale

Un dispositif de stimulation, qui peut s'incorporer sur le système d'imagerie optique, a été développé afin de pouvoir délivrer à la drosophile deux types de stimuli : olfactif et électrique. Le but est à terme de permettre l'apprentissage des drosophiles directement sous le microscope, grâce à des protocoles de conditionnement associatif olfactif aversif.

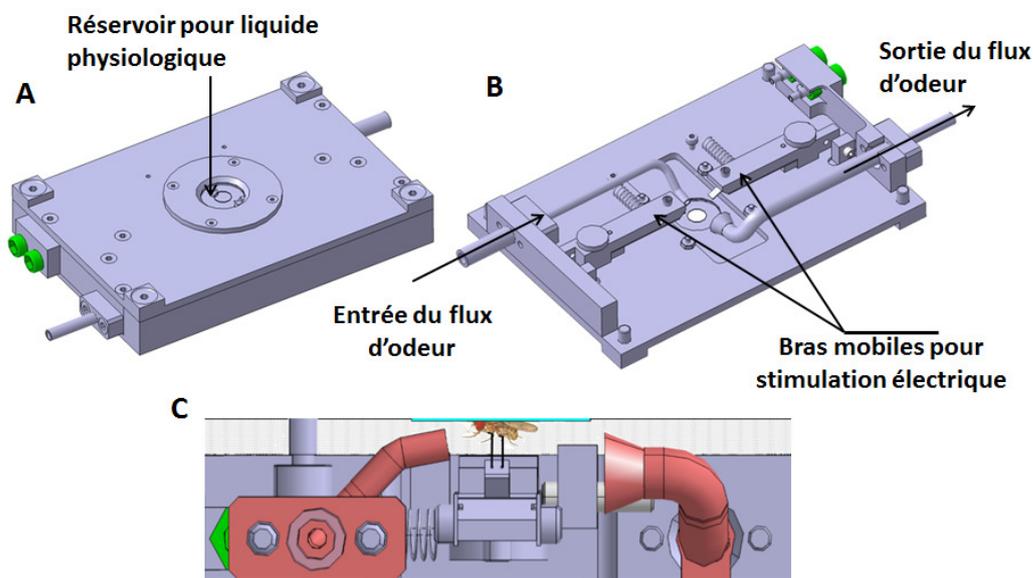


FIGURE 4.7 – (A) Vue globale de la cellule de stimulation des drosophiles. (B) Partie de la cellule constituant le dispositif de stimulation : tuyaux pour la stimulation olfactive et bras mobiles pour la stimulation électrique. (C) Vue de côté de la cellule de stimulation.

Le matériau composant la cellule de stimulation est du dural, alliage aluminium/cuivre, choisi pour sa facilité d'usinage par rapport à d'autres métaux. La figure 4.7 présente différentes vues de la cellule de stimulation. La drosophile, préparée pour l'imagerie, est positionnée au centre de la cellule. Une rondelle permet de créer un petit réservoir hermétique où du liquide physiologique est versé afin de baigner le cerveau. L'odeur est présentée à la drosophile grâce à un système de tuyaux. Le flux arrive au niveau de sa tête, et surtout au niveau de ses antennes, puis est recapté par un tuyau conique relié à une pompe aspiratrice. La cellule est fermée afin de permettre une bonne extraction des odeurs présentées. La partie stimulation électrique est assurée par deux bras mobiles indépendants qui permettent de positionner de façon précise les électrodes sur le corps de la drosophile. La position des électrodes est décrite en détail au Chapitre 5, où la stimulation électrique a joué un rôle capital (figure 5.6C).

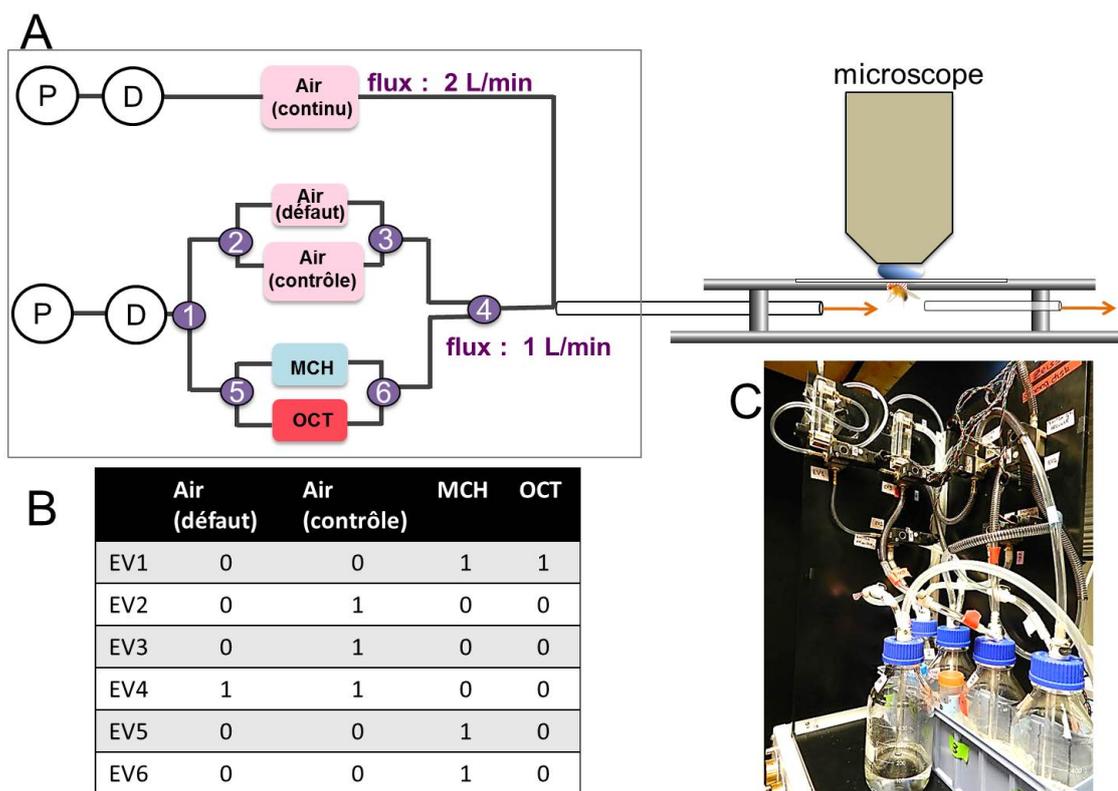


FIGURE 4.8 – (A) Schématisation du système de contrôle de l’envoi des odeurs vers la cellule pour l’imagerie fonctionnelle des réponses à une stimulation olfactive. P et D désignent respectivement les pompes et les débitmètres. Les chiffres de 1 à 6 correspondent aux différentes électrovannes du circuit. MCH : 4-méthylcyclohexanol. OCT : octan-3-ol. (B) Tableau récapitulatif des niveaux logiques TTL des différentes électrovannes, numérotées de 1 à 6, pour les configurations suivantes : configuration par défaut, envoi de l’air dit “contrôle”, envoi de l’odeur MCH, envoi de l’odeur OCT. Les signaux de déclenchement des électrovannes EV2 et EV3 ainsi que EV5 et EV6 sont deux à deux identiques. (C) Photographie du système où l’on peut voir les débitmètres, les électrovannes, le circuit de tuyaux ainsi que les bouteilles contenant le mélange huile/“odeur”.

#### 4.2.2.2 Le dispositif de stimulation olfactive

Le système de stimulation olfactive est schématisé sur la figure 4.8A. En amont du système se trouvent deux pompes. Une des deux pompes alimente un circuit de tuyaux contrôlé par une série d’électrovannes. Ces électrovannes permettent de générer différentes configurations de stimulation. Les tuyaux plongent dans des bouteilles contenant de l’huile de paraffine neutre, pour les configurations “air défaut” et “air contrôle”, ou additionnée de produit chimique : 4-méthylcyclohexanol (MCH, pureté égale à 99%, Fluka 66360, Sigma-Aldrich) ou octan-3-ol (OCT, pureté supérieure à 95%, Fluka 74878, Sigma-Aldrich). Ces produits étant hydrophobiques, les solutions sont préparées dans l’huile de paraffine inodore (VWR international, Sigma-Aldrich). Ces deux odeurs chimiques sont des alcools naturellement répulsifs pour les drosophiles et traditionnellement utilisées dans tous les protocoles de conditionnements as-

sociatifs faisant intervenir l'olfaction. 3 mL de produit sont dissous dans 100 mL d'huile de paraffine. Le flux sortant de cette partie du montage correspond à un tiers du flux total délivré à la drosophile. Les deux autres tiers du flux sont générés par une seconde pompe. Cette seconde pompe est reliée à un tuyau plongé dans une bouteille remplie d'huile de paraffine neutre qui crée un flux d'air principal constant au niveau de la drosophile quelque soit la configuration de stimulation choisie. En tenant compte de la dilution des produits chimiques dans l'huile de paraffine ainsi que du rapport entre le flux d'odeur et le flux d'air principal, la concentration finale en odeur arrivant au niveau des antennes de la drosophile est de 1%. Le flux principal continu permet de minimiser les variations brusques de débit au niveau de la tête de la drosophile qui pourraient entraîner une activité cérébrale au niveau des corps pédonculés sans que cette réponse soit liée à la stimulation olfactive. C'est pour éviter ce même artefact qu'une configuration appelée "air contrôle" a été créée. Elle permet de s'assurer que les réponses cérébrales observées ne sont pas de simples réponses dues aux turbulences d'air créées par le mouvement mécanique de basculement des électrovannes. Ce système d'envoi des odeurs est couplé à la cellule environnementale placée sous l'objectif du microscope. Pour éviter que l'odeur ne stagne dans la cellule, une autre pompe (non représentée sur la figure 4.8) permet d'évacuer l'odeur afin d'éviter une désensibilisation des récepteurs olfactifs de la drosophile. Les électrovannes sont contrôlées individuellement par des signaux logiques, issus d'une carte NI-USB (National Instrument), qui permettent de définir la configuration de stimulation désirée. Le détail des signaux logiques correspondant aux différentes configurations est donné à la figure 4.8B. Trois configurations de stimulation, sans compter la configuration par défaut du système d'électrovannes notée "air défaut", peuvent être choisies :

- a. "Air contrôle" : Flux d'air continu + flux d'air parallèle complétant le flux principal issu de l'actionnement des électrovannes. Cette configuration sert de contrôle pour déceler les artefacts de réponse dus à des variations de débit du flux.
- b. "MCH" : Flux d'air continu + flux d'air chargé de 4-méthylcyclohexanol complétant le flux principal.
- c. "OCT" : Flux d'air continu + flux d'air chargé d' octan-3-ol complétant le flux principal.

### 4.2.2.3 Le dispositif de stimulation électrique

Le système de stimulation électrique est constitué de deux éléments présentés sur la figure 4.9. L'élément S48 Square Pulse Stimulator (Grass Technologies, figure 4.9A) est un stimulateur permettant de délivrer des stimulations électriques, uniques ou répétées. La durée de la stimulation peut varier de 10  $\mu$ s à 10 secondes. Le taux de répétition des stimulations varie quant à lui de 0.01 Hz à 1000 Hz. Afin d'obtenir une intensité électrique contrôlée, on a couplé le S48 Square Pulse Stimulator au PSIU6 Photoelectric Isolation Unit (Grass Technologies, figure 4.9B). On a alors en sortie une source de courant contrôlée quelle que soit la résistance du circuit en aval (ce type de montage sera décrit plus en détail au Chapitre 5 où le dispositif de stimulation électrique n'est pas un système commercial mais a été développé par le service d'électronique du Laboratoire Aimé Cotton). La figure 4.9C montre la courbe de calibration de la stimulation électrique : on a une relation pratiquement linéaire entre la tension de stimulation choisie et l'intensité électrique délivrée. L'ensemble du dispositif de stimulation

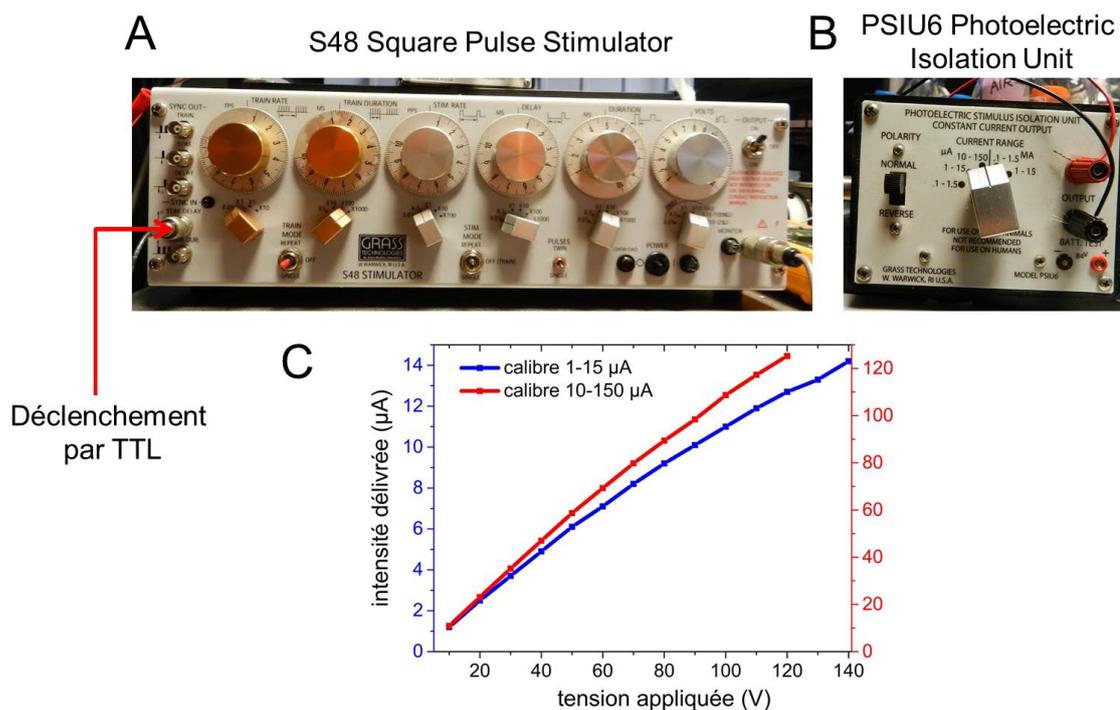


FIGURE 4.9 – Dispositif électronique de stimulation électrique. (A) Dispositif S48 Square Pulse Stimulator (Grass Technologies) permettant de contrôler la durée ainsi que l’amplitude des stimulations électriques. (B) Dispositif PSIU6 Photoelectric Isolation Unit (Grass Technologies). (C) Courbes de calibration de l’intensité électrique délivrée par le PSIU6 Photoelectric Isolation Unit (pour les 2 calibres : 1-15  $\mu\text{A}$  et 10-150  $\mu\text{A}$ ) en fonction de la tension délivrée par le S48 Square Pulse Stimulator. Les courbes de calibration ont été réalisées avec une drosophile entre les électrodes.

électrique peut être déclenché par un signal logique TTL.

#### 4.2.2.4 La synchronisation de l'imagerie et des stimuli

Une schématisation de la cascade de synchronisation est présentée sur la figure 4.10. La séquence de synchronisation est imposée par le microscope. Il envoie les signaux de déclenchement TTL soit au dispositif S48 Square Pulse Stimulator pour la stimulation électrique, soit vers une boîte NI-USB déclenchant à son tour les électrovannes qui assurent la stimulation olfactive. La figure 4.11 décrit en détail le protocole d'imagerie et de stimulation olfactive. La drosophile est soumise à trois cycles d'imagerie au cours desquels une stimulation olfactive transitoire est envoyée (figure 4.11A). Il peut s'agir soit de l'“air contrôle”, soit de l'odeur MCH, soit de l'odeur OCT. Entre chacun de ces cycles sont laissées trente secondes. La figure 4.11B détaille un cycle d'imagerie. Un protocole standardisé a été mis en place pour toutes les drosophiles imagées. Le cycle d'imagerie dure cinquante secondes au cours desquelles sont acquises 100 piles d'images des corps cellulaires des cellules de Kenyon (avec les deux voies spectrales d'émission verte et rouge). Chaque pile d'images contient 25 sections ayant une durée d'acquisition de 20 ms chacune. Le pas spatial axial entre chacune des images est de 2  $\mu\text{m}$ . On image donc une tranche

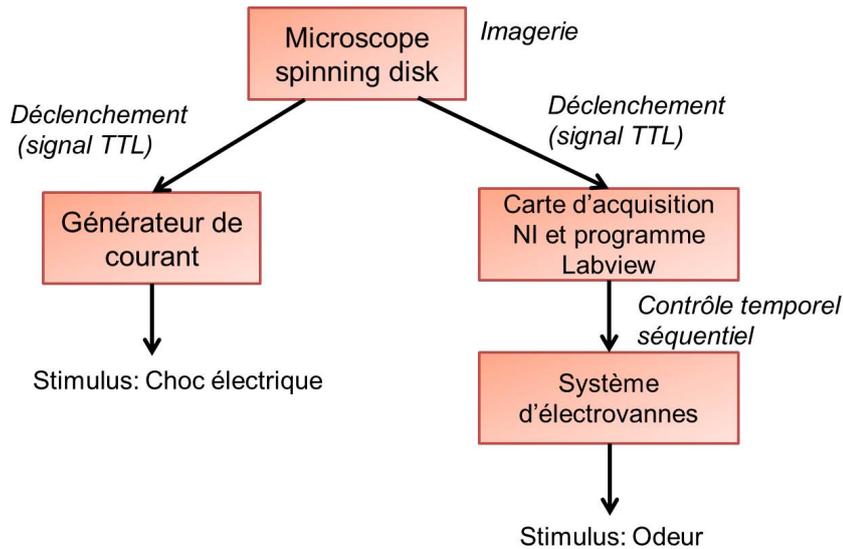


FIGURE 4.10 – Schéma de principe de la synchronisation de l'ensemble du dispositif : Imagerie et stimulations olfactive ou électrique

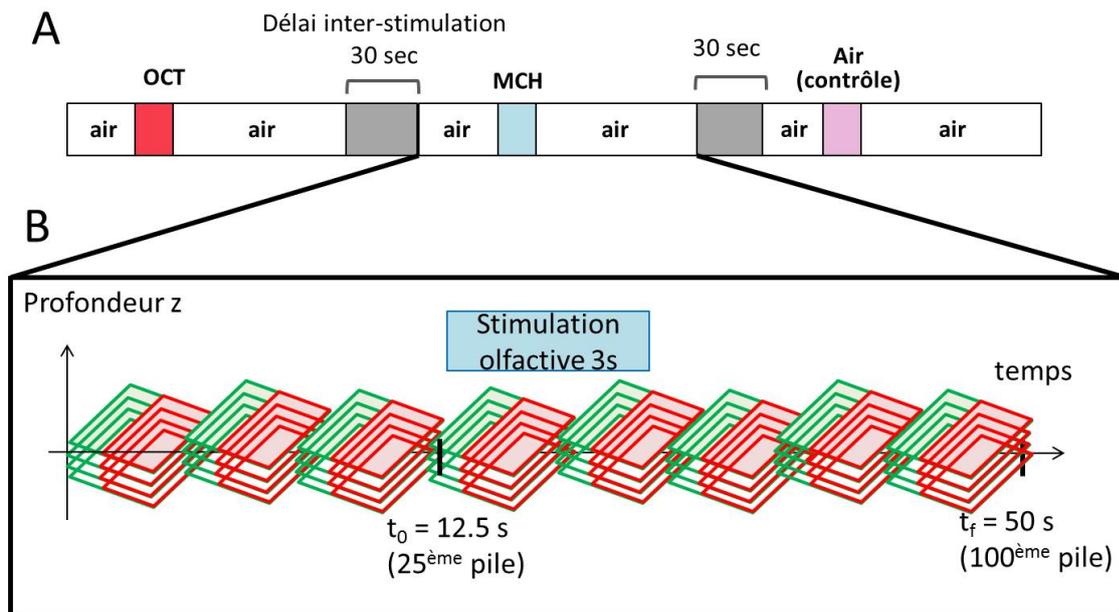


FIGURE 4.11 – Protocole d'imagerie et chronogramme standardisés pour la stimulation par des odeurs. (A) Vue générale des trois cycles d'imagerie et de stimulation : "OCT", "MCH" et "air contrôle". Chacune de ces stimulations ne dure que 3 secondes. Durant le reste de l'expérience, de l'air neutre, configuration "air défaut", est envoyé vers la tête de la drosophile. (B) Détail d'un cycle d'imagerie. Les rectangles verts et rouges représentent les deux voies d'imagerie de la caméra.

d'épaisseur  $50 \mu\text{m}$  dans l'échantillon avec une fréquence d'acquisition de 2 Hz. La stimulation olfactive est déclenchée par TTL au niveau de la 25<sup>ème</sup> pile d'images et dure trois secondes.

### 4.2.3 Les lignées de drosophiles

#### 4.2.3.1 Le marquage bi-couleur

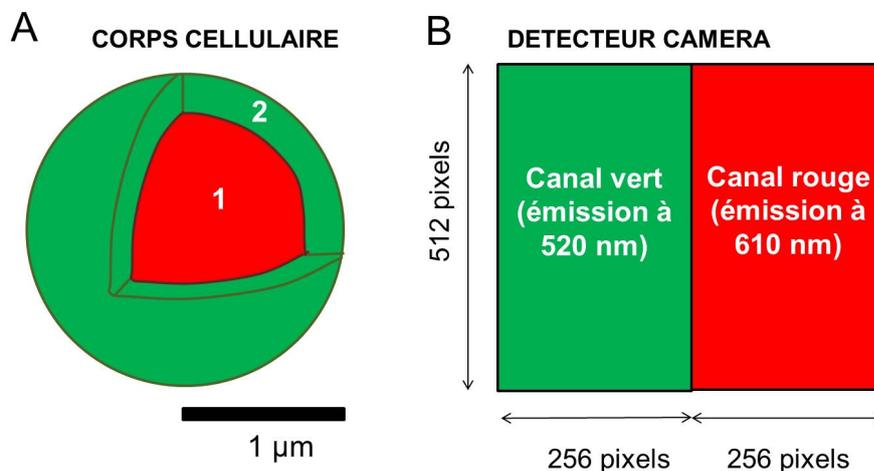


FIGURE 4.12 – (A) Représentation schématique d'un corps cellulaire de cellule de Kenyon doublement marqué. (1) Un marquage rouge avec la protéine fluorescente mCherry est utilisé pour le noyau. (2) Un marquage vert est utilisé pour l'imagerie fonctionnelle. Si la sonde utilisée est la sonde calcique G-CaMP6f, le marquage est cytoplasmique alors qu'il est membranaire si la sonde utilisée est la sonde voltage ArcLight. (B) Partage du capteur de la caméra EMCCD suivant le principe Dualview décrit précédemment. Le capteur, de taille totale 512×512 pixels, est scindé en deux zones de 512×256 pixels. Chacune des sous-parties est dédiée à l'imagerie d'une des deux protéines fluorescentes : G-CaMP6f (ou ArcLight) et mCherry-NLS.

Un double marquage génétiquement encodé a été développé pour cette étude. Une sonde fluorescente verte est utilisée afin de suivre l'activité des neurones. Il s'agit soit de la sonde calcique G-CaMP6f soit de la sonde voltage ArcLight. Les neurones des cellules de Kenyon ont été également marqués avec une protéine fluorescente encodée génétiquement émettant dans le rouge, appelée mCherry-NLS, qui est exprimée spécifiquement dans leur noyau. Ce deuxième marquage permet de créer des repères morphologiques facilitant le traitement *a posteriori* des images. Les lignées transgéniques de drosophiles utilisées sont notées :  $238y-GAL4, UAS-mCherry-NLS/+$ ,  $UAS-G-CaMP6f/+$  et  $238y-GAL4, UAS-mCherry-NLS/+$ ,  $UAS-ArcLight/+$ . Une schématisation du marquage bi-couleur, adapté à notre système d'imagerie DualView, est présentée à la figure 4.12. Les spectres d'absorption et d'émission des deux fluorophores, G-CaMP6f et mCherry, sont présentés à la figure 4.13. La sonde G-CaMP6f a son maximum d'excitation à 490 nm et a son pic d'émission centré sur 510 nm. La protéine mCherry absorbe quant à elle majoritairement à 590 nm et émet à 610 nm.

#### 4.2.3.2 Préparation de la drosophile

La drosophile est préparée pour l'imagerie comme présenté dans la section 1.4 du Chapitre 1. L'utilisation d'un gel d'agarose pour réduire les mouvements du cerveau de la drosophile est ici

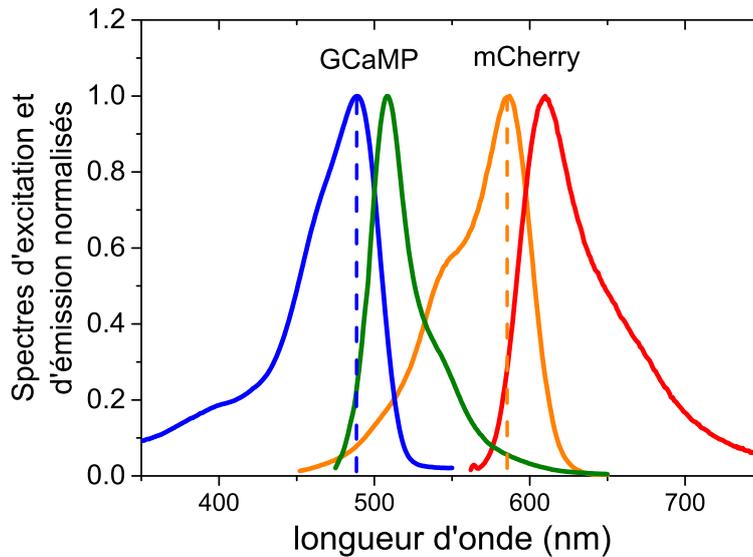


FIGURE 4.13 – Spectres d’absorption et d’émission normalisés des deux fluorophores : G-CaMP6f et mCherry. Les lignes pointillées correspondent aux deux raies laser présentes sur le dispositif de microscopie multiconfocale utilisé.

primordiale. En effet, des mouvements de trop grande amplitude pourraient compromettre le suivi des cellules de Kenyon à l’échelle individuelle au cours du temps. La tête de la drosophile doit être précisément orientée de façon à pouvoir imager les corps cellulaires des neurones des corps pédonculés qui se trouvent à l’arrière de la tête. De plus, une attention particulière doit être portée aux antennes. Celles-ci ne doivent pas être engluées pour les expériences d’imagerie fonctionnelle en réponse à des stimulations olfactives. Le corps de la drosophile ne doit avoir aucun résidu de colle afin d’assurer un contact électrique convenable avec les électrodes de stimulation.

#### 4.2.3.3 Test pharmacologique de l’état de forme de la drosophile pour les études fonctionnelles

Les expérimentations d’imagerie fonctionnelle sont suivies d’un test pharmacologique permettant de s’assurer que les neurones de la drosophile répondent normalement à une dépolarisation provoquée chimiquement et que les résultats seront alors exploitables. Pour cela, une solution de chlorure de potassium ( $K^+ + Cl^-$ ) est incorporée au liquide physiologique baignant déjà le cerveau de la drosophile. L’ajout du chlorure de potassium conduit, dans un cerveau sain, à la dépolarisation massive des neurones. Des exemples d’application de chlorure de potassium sont montrés sur les figures 4.14 et 4.15. La dépolarisation des neurones se traduit par une entrée d’ions calcium au sein des neurones et donc à une augmentation de la fluorescence de la sonde calcique G-CaMP6f (figure 4.14). On observe une chute de l’intensité de fluorescence dans le cas de la sonde voltage ArcLight (figure 4.15) car une variation de fluorescence négative pour cette sonde indique une dépolarisation des neurones.

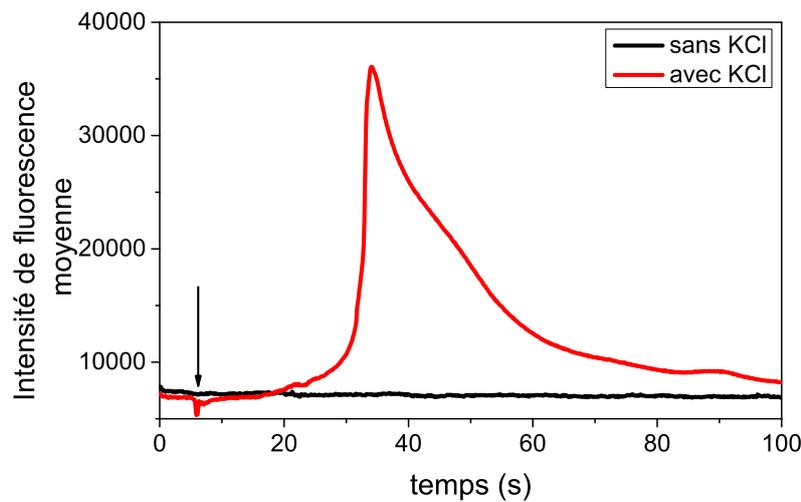


FIGURE 4.14 – Variation de l'intensité de fluorescence des cellules de Kenyon au cours du temps lorsque du chlorure de potassium est utilisé comme contrôle de l'état de forme des drosophiles de lignée *238y-GAL4, UAS-mCherry-NLS/+ , UAS-G-CaMP6f/+* à la fin de l'expérimentation. La flèche indique l'ajout de 10  $\mu\text{L}$  de solution de KCl à 1 M dans le liquide physiologique baignant le cerveau de la drosophile.

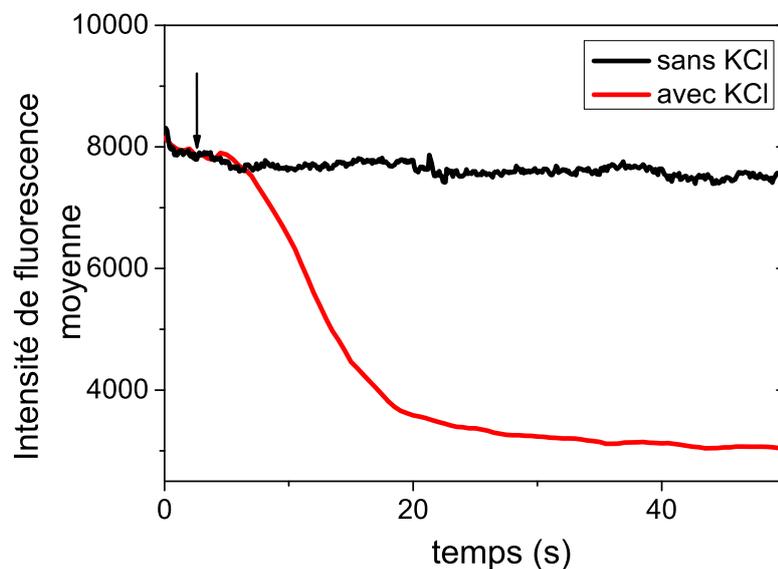


FIGURE 4.15 – Variation de l'intensité de fluorescence des cellules de Kenyon au cours du temps lorsque du chlorure de potassium est utilisé comme contrôle de l'état de forme des drosophiles de lignée *238y-GAL4, UAS-mCherry-NLS/+ , UAS-ArcLight/+* à la fin de l'expérimentation. La flèche indique l'ajout de 10  $\mu\text{L}$  de solution de KCl à 1 M dans le liquide physiologique baignant le cerveau de la drosophile.

## 4.3 Imagerie des corps cellulaires et difficultés rencontrées

Avant de s'intéresser à l'imagerie fonctionnelle, des expériences d'imagerie morphologique ont été menées. Les corps cellulaires des neurones des corps pédonculés ont été imagés en profondeur en fonction du temps et en imagerie bi-couleur. Je présenterai ici quelques images typiques pour les drosophiles de lignées *238y-GAL4, UAS-mCherry-NLS/+*, *UAS-ArcLight/+* et *238y-GAL4, UAS-mCherry-NLS/+*, *UAS-G-CaMP6f/+*. Des notations simplifiées de ces génotypes, présentées dans le tableau 4.3, seront employées par la suite. Le pilote d'expression *238y-GAL4* permet une expression des sondes fluorescentes d'intérêt dans l'ensemble des neurones des corps pédonculés. Les images morphologiques ont permis de mettre en lumière les principales difficultés pour la réussite du projet de suivi des neurones individuels, au sein du réseau neuronal global, au cours d'un événement de mémorisation : l'anisotropie de résolution spatiale, le mouvement de l'échantillon, les contributions des aberrations optiques en profondeur et du photoblanchiment des sondes fluorescentes encodées génétiquement.

Génotypes	Notations simplifiées
<i>238y-GAL4, UAS-mCherry-NLS/+</i> , <i>UAS-ArcLight/+</i>	"mCherry/ArcLight"
<i>238y-GAL4, UAS-mCherry-NLS/+</i> , <i>UAS-G-CaMP6f/+</i>	"mCherry/G-CaMP6f"

Tableau 4.3 – Tableau présentant les génotypes utilisés ainsi que les abréviations utilisées dans la suite.

### 4.3.1 Imagerie 5D ( $X, Y, Z, t, \lambda$ ) des corps cellulaires

#### 4.3.1.1 Imagerie "mCherry/ArcLight"

La figure 4.16 présente un exemple d'imagerie bi-couleur des corps cellulaires d'une drosophile "mCherry/ArcLight" avec l'objectif de grandissement  $63\times$ . Les figures 4.16A et B correspondent aux deux voies spectrales d'imagerie du microscope. Ces deux images sont acquises simultanément sur la caméra grâce au système DualView, comme décrit dans la partie 4.2.1.4. Sur les figures 4.16A et B, on distingue correctement, respectivement, les noyaux des corps cellulaires marqués avec la protéine fluorescente rouge mCherry ainsi que les membranes des neurones exprimant la sonde fluorescente verte ArcLight. Les figures 4.16C, D et E représentent la superposition des deux images monospectrales pour trois profondeurs différentes dans le cerveau de la drosophile.

On remarque sur la figure 4.16 que l'ensemble des corps cellulaires ne peuvent pas être imagés simultanément du fait du champ trop faible de l'objectif  $63\times$  (la partie supérieure droite de l'image apparaît tronquée). Afin de pallier ce problème, des images ont alors été réalisées avec l'objectif de grandissement  $40\times$ . La figure 4.17 montre un exemple d'imagerie de

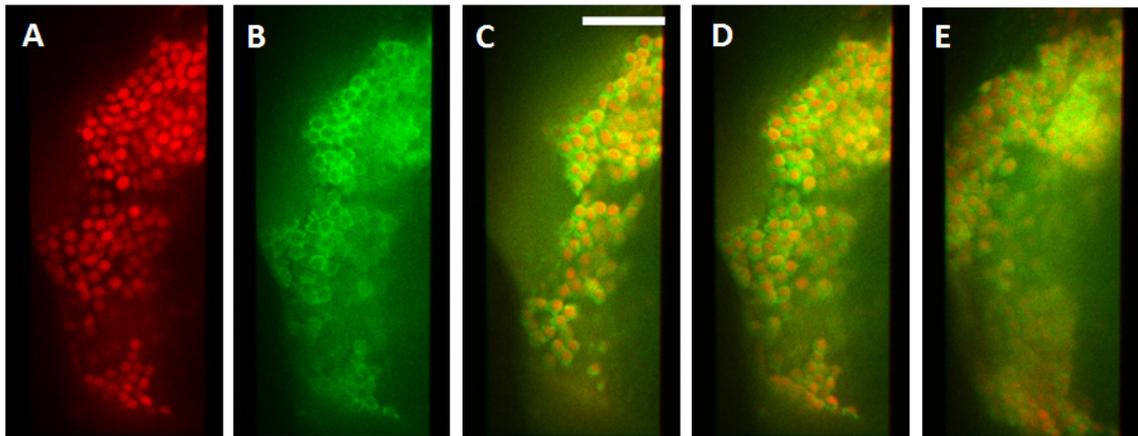


FIGURE 4.16 – Imagerie bi-couleur des corps cellulaires d'une drosophile "mCherry/ArcLight" avec l'objectif de grandissement 63 $\times$ . (A) Voie d'imagerie rouge (émission de la protéine fluorescente mCherry-NLS). (B) Voie d'imagerie verte (émission de la protéine fluorescente ArcLight). (C), (D), (E) : Superposition des deux voies d'imagerie : mCherry-NLS et ArcLight pour trois profondeurs dans le cerveau de la drosophile. 12  $\mu$ m de profondeur séparent les images (C) et (E). Barre d'échelle : 10  $\mu$ m.

corps cellulaires d'une drosophile "mCherry/ArcLight", où l'ensemble des neurones ont pu être imagés.

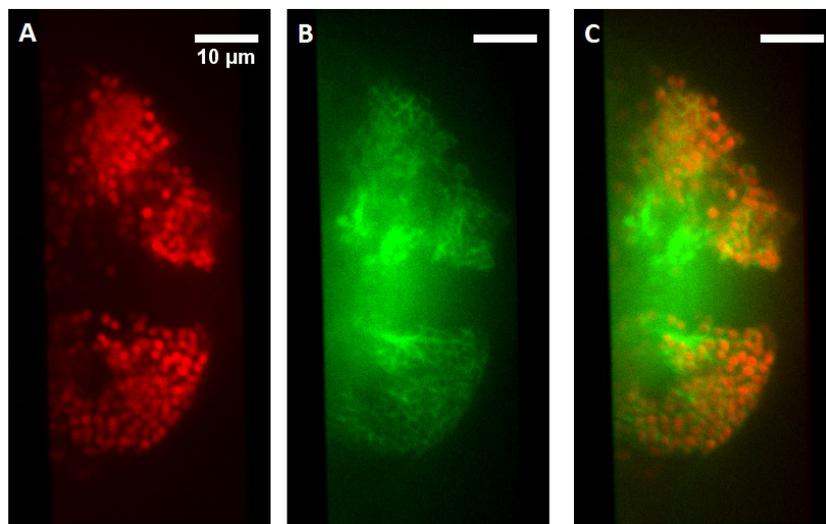


FIGURE 4.17 – Imagerie bi-couleur des corps cellulaires d'une drosophile de lignée "mCherry/ArcLight" avec l'objectif de grandissement 40 $\times$ . (A) Voie d'imagerie rouge (émission de la protéine fluorescente mCherry-NLS). (B) Voie d'imagerie verte (émission de la protéine fluorescente ArcLight). (C) Superposition des deux voies d'imagerie : mCherry-NLS et ArcLight. Une seule profondeur dans le cerveau de la drosophile est montrée. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m.

#### 4.3.1.2 Imagerie “mCherry/G-CaMP6f”

L'imagerie morphologique a également été réalisée sur des drosophiles “mCherry/G-CaMP6f”. Un exemple est montré à la figure 4.18. L'expression de la sonde G-CaMP6f n'est pas membranaire, comme la sonde ArcLight, mais exprimée dans le cytoplasme des neurones. Le niveau de fluorescence à l'état basal de la sonde fluorescente G-CaMP6f est moins important que celui de la sonde voltage ArcLight (comme il sera démontré au Chapitre 5).

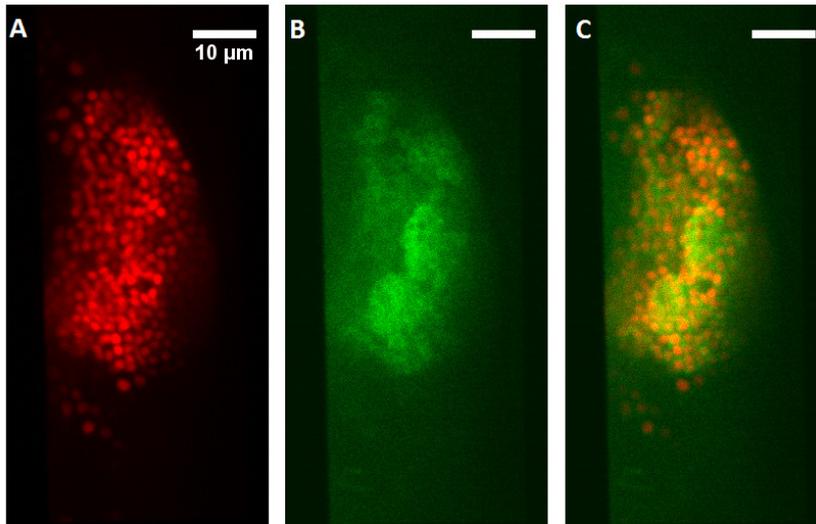


FIGURE 4.18 – Imagerie bi-couleur des corps cellulaires d’une drosophile “mCherry/G-CaMP6f” avec l’objectif de grandissement 40×. (A) Voie d’imagerie rouge (émission de la protéine fluorescente mCherry-NLS). (B) Voie d’imagerie verte (émission de la protéine fluorescente G-CaMP6f). (C) Superposition des deux voies d’imagerie : mCherry-NLS et G-CaMP6f. Une seule profondeur dans le cerveau de la drosophile est montrée. Barre d’échelle : 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2 Anisotropie de résolution

La figure 4.19 présente l'imagerie des noyaux des corps cellulaires des cellules de Kenyon pour des drosophiles de lignée “mCherry/G-CaMP6f” avec les objectifs de grandissement 63× (figure 4.19A) et 40× (figure 4.19B). La première constatation est l'anisotropie de résolution entre les axes latéraux et l'axe axial, axe de propagation de la lumière dans le microscope. Pour les deux objectifs, les noyaux semblent “étirés” dans la direction axiale du fait d’une résolution axiale plus faible que la résolution latérale, comme nous l’avons montré par la détermination des PSF dans la partie 4.2.1.5 (figure 4.4). Cette limitation est une propriété intrinsèque affectant tous les microscopes optiques limités par la diffraction. On constate également que l'imagerie est moins résolue en utilisant l'objectif de grandissement 40× (figure 4.19B) qu'en utilisant celui de grandissement 63× (figure 4.19A). Cette dégradation de résolution affecte plus particulièrement la direction axiale. Si cet effet venait à mettre en péril la détection correcte des noyaux, deux solutions techniques pourraient être envisagées. La première consisterait à remplacer la caméra existante par une caméra avec un détecteur plus étendu, de façon à pouvoir imager l'ensemble des corps cellulaires tout en gardant la bonne résolution spatiale assurée par l'utilisation de

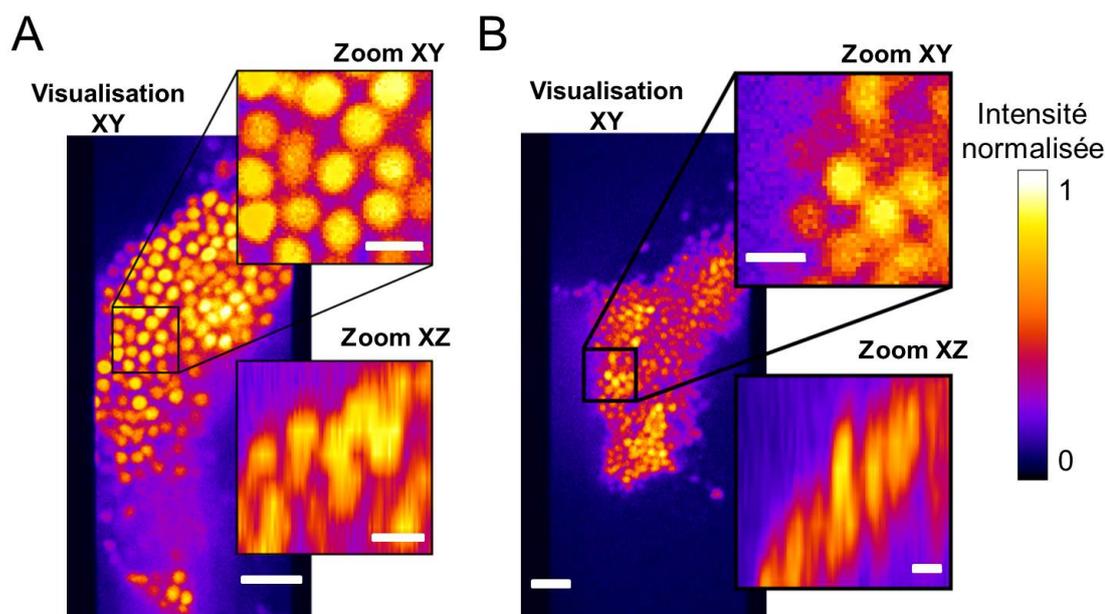


FIGURE 4.19 – Imagerie mCherry des noyaux des corps cellulaires d’une drosophile de lignée “mCherry/G-CaMP6f” pour les objectifs de grandissement  $63\times$  et  $40\times$ . (A) Imagerie des noyaux avec l’objectif  $63\times$ . (B) Imagerie des noyaux avec l’objectif  $40\times$ . Pour (A) et (B), une vue latérale  $(X, Y)$  ainsi que deux agrandissements latéraux  $(X, Y)$  et axiaux  $(X, Z)$  sont présentés. Barre d’échelle des figures principales :  $10\ \mu\text{m}$ . Barre d’échelle des agrandissements :  $2\ \mu\text{m}$ .

l’objectif de grandissement  $63\times$ . La deuxième solution serait de garder la caméra actuelle mais de changer la tête confocale, c’est-à-dire les disques de Nipkow, afin d’adapter le diamètre des trous confocaux à l’utilisation de l’objectif de grandissement  $40\times$ . Les résultats du programme de détection des noyaux, développé par Felipe Delestro, doctorant sous la direction de Auguste Genovesio à l’Institut de Biologie de l’Ecole Normale Supérieure de Paris, permettront de savoir si ces modifications techniques se révèlent indispensables ou si la résolution spatiale du système d’imagerie multiconfocale, en l’état, est suffisante pour mener à bien notre projet.

### 4.3.3 Imagerie bi-couleur et mouvement

Nos premières expériences ont révélé des mouvements résiduels du cerveau malgré la mise en place d’un gel d’agarose qui absorbe la majorité des mouvements. Il s’agit d’un mouvement complexe, constitué non seulement de translations, mais également de déformations. En effet, la zone imagée ici dans le cerveau se situe près du proboscis de la drosophile. Le proboscis est l’appendice permettant à la drosophile de se nourrir. Lorsque celle-ci étend ou rétracte son proboscis au cours de l’imagerie, un mouvement de déformation impacte le cerveau. Ces mouvements entraînent des variations de fluorescence sur les images résultantes, sans lien avec l’activité neuronale. Cet artefact peut être en partie repéré grâce à l’imagerie bi-couleur. On dispose en effet d’un contrôle intrinsèque, pour l’imagerie fonctionnelle, grâce aux deux voies spectrales d’imagerie acquises simultanément. La figure 4.20 représente l’évolution de l’inten-

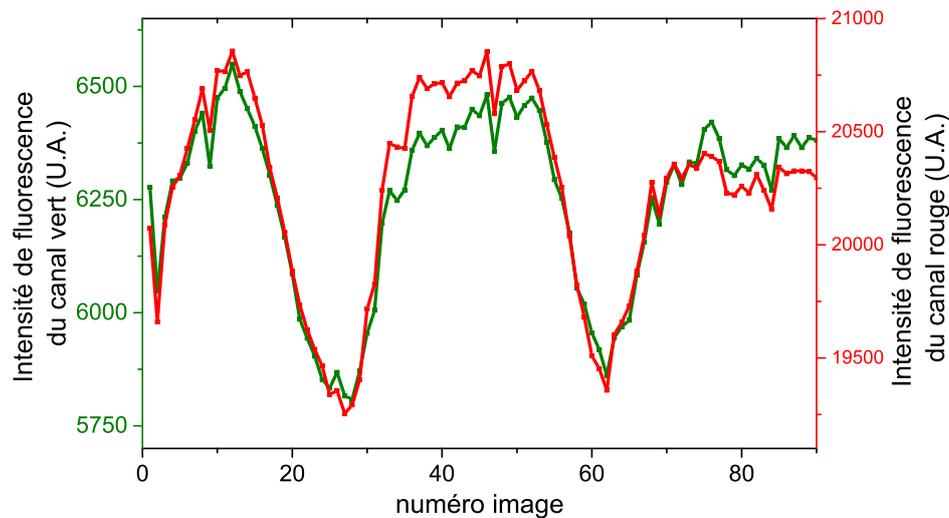


FIGURE 4.20 – Graphique représentant l’intensité de fluorescence des voies verte (activité fonctionnelle + mouvement) et rouge (mouvement seul) au cours du temps, en l’absence de stimulation, pour un plan fixe au niveau des corps cellulaires d’une drosophile de lignée “mCherry/G-CaMP6f”.

sité de fluorescence au niveau des corps cellulaires des cellules de Kenyon pour les deux voies d’imagerie mCherry et G-CaMP6f. La protéine encodée génétiquement mCherry est une sonde morphologique, c’est-à-dire que son intensité de fluorescence ne dépend pas de l’activité neuronale. Cela est vrai tant qu’on néglige le photoblanchiment qui, quoi qu’il en soit, fait varier le signal de fluorescence de façon monotone (décroissante) et non de manière “oscillante” comme cela est le cas en présence de mouvements. Aussi, nous pouvons en première approximation considérer les variations de l’intensité de fluorescence de mCherry comme étant dues à des artefacts de mouvement. Au contraire, la sonde calcique G-CaMP6f est une sonde fonctionnelle permettant de suivre l’activité neuronale optiquement par des variations d’intensité de fluorescence. Ainsi, sur la figure 4.20, l’observation d’une évolution synchrone des intensités de fluorescence des deux voies mCherry et G-CaMP6f témoigne non d’une activité neuronale, mais d’un simple artefact dû au mouvement du cerveau.

#### 4.3.4 Extension axiale des corps cellulaires des cellules de Kenyon et imagerie 3D

Le mouvement du cerveau de la drosophile n’est pas la seule difficulté du projet d’imagerie exhaustive des corps cellulaires. L’extension spatiale en profondeur des corps cellulaires rend absolument indispensable l’imagerie tridimensionnelle rapide du cerveau. La figure 4.21 montre l’évolution de l’intensité de fluorescence de la protéine mCherry en fonction de la profondeur au niveau des corps cellulaires. On remarque que la majorité des corps cellulaires des neurones sont répartis sur environ 30  $\mu\text{m}$  en profondeur. Cette extension axiale a une répercussion sur l’imagerie. En effet, la traversée du cerveau de la drosophile ajoute des aberrations optiques

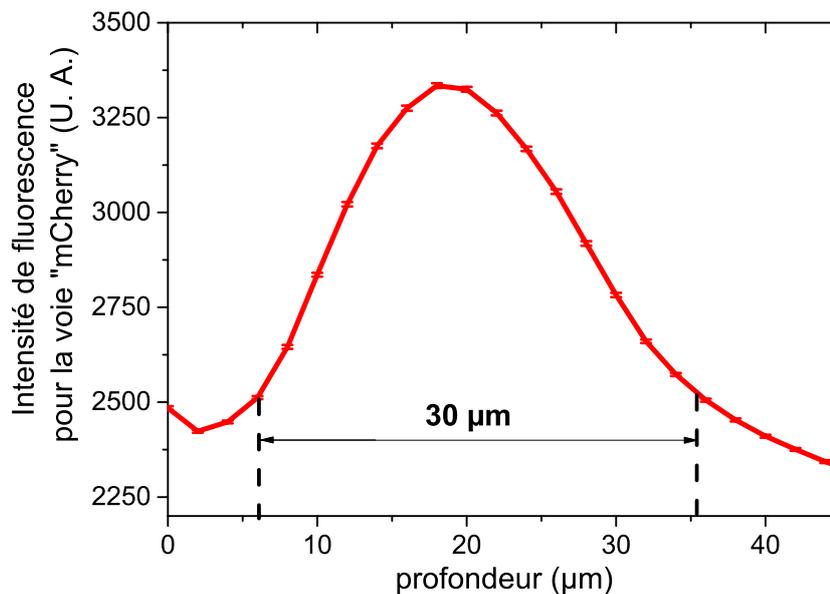


FIGURE 4.21 – Graphique représentant l’intensité de fluorescence de la voie rouge (mCherry-NLS) en fonction de la profondeur au niveau des corps cellulaires d’une drosophile de lignée “mCherry/G-CaMP6f”.

au niveau de l’imagerie de fluorescence. Ainsi, la résolution spatiale ne sera pas la même pour l’imagerie de corps cellulaires en surface ou à  $30\ \mu\text{m}$  de profondeur, du fait de la dégradation de la PSF par les aberrations optiques introduites par le cerveau. On peut noter que les valeurs de PSF déterminées dans la partie 4.2.1.5 l’ont été à l’aide de billes dans un échantillon de gel d’agarose, et non au sein d’un échantillon biologique épais, plus aberrant et plus diffusant. La figure 4.22 montre l’impact de la profondeur d’imagerie sur la résolution latérale ainsi que sur la forme des noyaux imagés. Les profils présentés sur la figure 4.22C montrent que le contraste entre l’intensité de fluorescence du noyau et le fond est deux fois plus faible à  $30\ \mu\text{m}$  de profondeur qu’à la surface, ce qui rend plus compliqué la détection informatique des noyaux. On constate également que l’intensité de fluorescence par noyau récoltée au niveau du détecteur est moindre à  $30\ \mu\text{m}$  de profondeur par rapport à la surface.

### 4.3.5 Photoblanchiment des sondes fluorescentes

Le photoblanchiment est un phénomène photochimique qui conduit à la dégradation irréversible du fluorophore qui cesse alors d’émettre. Ce phénomène se produit après une exposition “prolongée” à la lumière d’excitation et dépend de la puissance et de la durée de cette illumination. De plus, chaque fluorophore a sa propre cinétique de photoblanchiment. Lorsque la zone illuminée contient un grand nombre de fluorophores susceptible de diffuser, l’intensité de fluorescence peut revenir à son niveau initial après une illumination suivie d’une période d’obscurité, grâce à la diffusion dans le champ illuminé de fluorophores intacts. C’est d’ailleurs le principe de la technique de microscopie optique FRAP pour Fluorescence Recovery After Pho-

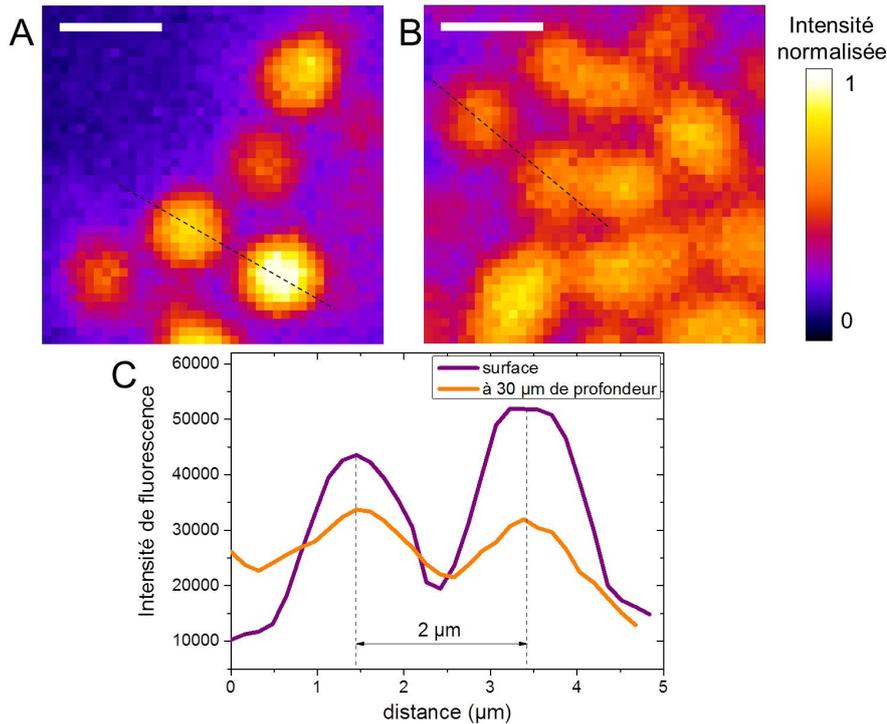


FIGURE 4.22 – Imagerie des noyaux des corps cellulaires (mCherry) pour deux profondeurs dans le cerveau d’une drosophile de lignée “mCherry/G-CaMP6f”. L’objectif utilisé est celui de grandissement 40×. (A) Imagerie en surface. (B) Imagerie à 30 µm de profondeur. Barre d’échelle : 2 µm. (C) Profils d’intensité de fluorescence en surface et à 30 µm de profondeur. Les profils correspondent aux lignes en pointillés tracées sur les images (A) et (B). Pour des soucis de clarté, du fait de la densité de noyaux, la reconstruction axiale n’est pas présentée.

tobleaching. Dans notre cas, ce phénomène de diminution de la fluorescence des sondes n’est pas un atout, et il peut rendre délicat le suivi des neurones individuels s’il est trop prononcé. La figure 4.23 montre l’évolution de la fluorescence des deux sondes mCherry et G-CaMP6f en profondeur au niveau des corps cellulaires avant et après 450 secondes d’imagerie. Cette durée d’imagerie est significativement plus grande que le temps d’enregistrement des expériences qui seront menées ultérieurement, où seront enregistrées les réponses olfactives avant et après conditionnement. Cela représentera typiquement une minute d’enregistrement continu. On observe sur la figure 4.23E une réduction de l’intensité de fluorescence moyenne d’un facteur 1.8 pour mCherry et 1.3 pour la sonde G-CaMP6f. La sonde calcique G-CaMP6f est donc moins impactée par ce phénomène que la protéine mCherry, dans nos conditions d’imagerie. Le point crucial, qui sera discuté dans la partie 4.5, concerne la détection des noyaux marqués avec la protéine fluorescente mCherry malgré le photoblanchiment. Concernant la sonde fonctionnelle G-CaMP6f qui permet de suivre la réponse des neurones aux différentes stimulations, le paramètre important qui sera déterminé est la variation de fluorescence normalisée  $\Delta F/F_0$ . Cette normalisation, par le niveau de fluorescence à l’état basal  $F_0$ , permet de s’affranchir de l’effet du photoblanchiment dans la mesure où toutes les sections imagées présentent le même photoblanchiment.

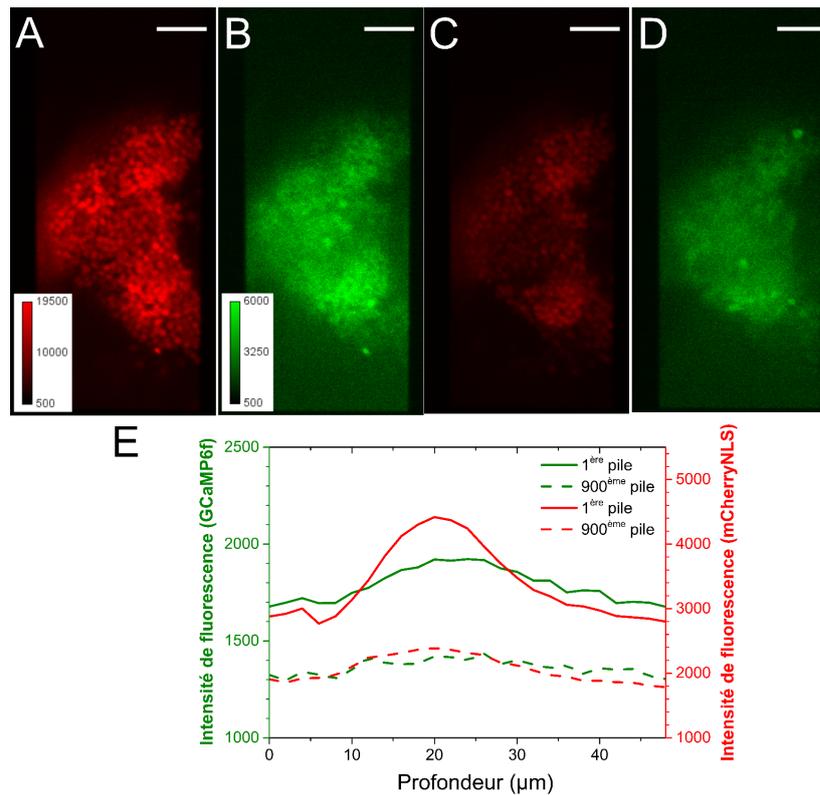


FIGURE 4.23 – Évaluation du photoblanchiment au niveau des corps cellulaires des cellules de Kenyon pour les deux voies d'imagerie sur une drosophile de lignée "mCherry/G-CaMP6f". Les images sont extraites d'un cycle d'imagerie comprenant 900 piles d'images de 25 sections chacune (avec une pause correspondant à un arrêt de l'illumination toutes les 100 piles d'images). La durée d'exposition de chaque section est 20 ms. (A) Voie rouge mCherry (noyau) pour une profondeur de 22  $\mu\text{m}$  sous la première section. (B) Voie verte (sonde calcique G-CaMP6f) correspondante. (C) Voie rouge mCherry (noyau) pour la même section après l'acquisition de 900 piles d'images, correspondant à une exposition totale de 450 s aux deux laser d'excitation. (D) Voie verte correspondante. Barres d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . (E) Graphique montrant l'évolution de l'intensité de fluorescence des deux fluorophores G-CaMP6f (en vert) et mCherry (en rouge) avec la profondeur pour la 1<sup>ère</sup> et la 900<sup>ème</sup> pile d'images.

## 4.4 Imagerie fonctionnelle des corps cellulaires et analyse globale

Les drosophiles ont été stimulées soit olfactivement soit avec des micro-chocs électriques qui sont les deux composantes intervenant dans un conditionnement de type associatif olfactif aversif. Ce type de conditionnement est le plus couramment utilisé pour la drosophile [16, 17, 18]. Des études ont montré que seul un faible pourcentage des cellules de Kenyon répondent à une stimulation olfactive [27], et une réponse aux chocs électriques dans les cellules de Kenyon a déjà été observée [191]. Pour la compréhension de la mémorisation, toute la difficulté résidera dans l'identification spécifique des neurones associant l'information des deux types de stimu-

lation. Cette sous-section vise à démontrer l'efficacité de notre cellule environnementale pour délivrer des stimulations olfactives ou électriques. Les réponses aux différents stimuli ont été analysées de manière globale, c'est-à-dire de façon moyennée sur l'ensemble des corps cellulaires des cellules de Kenyon. Le développement de l'algorithme permettant le traitement des réponses aux stimuli, neurone par neurone, sera présenté dans la partie 4.5.

#### 4.4.1 Réponse à des stimulations électriques dans les corps cellulaires des cellules de Kenyon

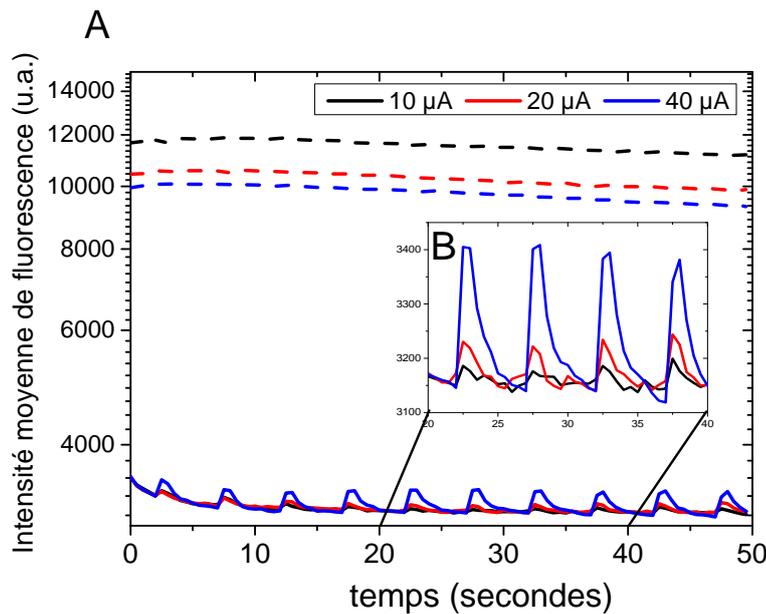


FIGURE 4.24 – Analyse globale, à l'échelle de toutes les cellules de Kenyon, de la réponse aux stimulations électriques pour une drosophile de lignée “mCherry/G-CaMP6f”. (A) Évolution de la fluorescence de la sonde calcique G-CaMP6f (traits pleins) et de la sonde morphologique mCherry-NLS (traits en pointillés) pour différentes intensités de stimulation : 10, 20 et 40  $\mu\text{A}$ . (B) Évolution de la fluorescence de la sonde calcique G-CaMP6f pour différentes intensités de stimulation : 10, 20 et 40  $\mu\text{A}$ .

Le système de stimulation par micro-chocs électriques a été testé sur les deux lignées de drosophiles “mCherry/G-CaMP6f” et “mCherry/ArcLight”. Les paramètres utilisés pour la stimulation électrique se rapprochent de ceux utilisés lors des conditionnements : 10 chocs de 1.2 secondes chacun ont été délivrés toutes les 5 secondes. La figure 4.24 montre le résultat d'une analyse globale de l'ensemble des neurones des corps pédonculés (d'un hémisphère) en réponse aux stimulations électriques. On observe des pics de fluorescence, synchrones de l'envoi des stimulations électriques, au niveau de la fluorescence de la voie d'imagerie verte, correspondant à la G-CaMP6f (figure 4.24B). On constate que l'amplitude de la réponse dépend de l'intensité électrique de la stimulation. On obtient des variations de fluorescence d'environ 2, 2.5 et 8% respectivement pour des stimulations de 10, 20 et 40  $\mu\text{A}$ . La stimulation

## Chapitre 4. Microscopie multiconfocale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

électrique a tendance à provoquer chez la drosophile un petit sursaut. De façon à s'assurer que les pics observés ne sont pas juste dus à un artefact de mouvement, la seconde voie d'imagerie est utilisée comme contrôle. On n'observe aucun pic de fluorescence au niveau de l'intensité de fluorescence de la mCherry (figure 4.24A, traits en pointillés). Les pics de fluorescence observés avec la sonde calcique G-CaMP6f correspondent donc bien à une activité neuronale engendrée par la stimulation.

On observe sur la figure 4.24A un phénomène de photoblanchiment rapide de la sonde G-CaMP6f se produisant les dix premières secondes de chaque cycle d'imagerie. Néanmoins, le niveau de fluorescence au début de chaque cycle d'imagerie revient à son état initial. Cela témoigne de la diffusion et de la redistribution des molécules fluorescentes G-CaMP6f dans la zone illuminée. Au contraire, la sonde mCherry-NLS semble présenter plus de photoblanchiment irréversible car le niveau de fluorescence ne revient pas au niveau de base au début de chaque cycle d'imagerie. L'origine de cet effet est probablement la localisation nucléaire de la sonde mCherry. En effet, pour des raisons de volume, le stock de fluorophores est plus faible dans le noyau que dans le cytoplasme.

### 4.4.2 Réponse à des stimulations olfactives dans les corps cellulaires des cellules de Kenyon

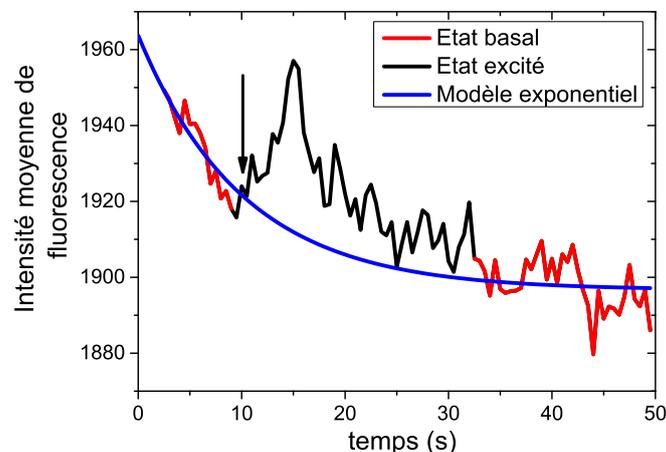


FIGURE 4.25 – Intensité moyenne de fluorescence de la sonde G-CaMP6f au cours d'une stimulation olfactive et modélisation exponentielle du niveau de fluorescence de base pour s'affranchir du photoblanchiment. La flèche indique l'instant où l'odeur est envoyée.

Les réponses à des stimulations olfactives ont également été étudiées de manière globale au sein des corps cellulaires des cellules de Kenyon. Le protocole d'imagerie associée à la stimulation olfactive est celui présenté sur la figure 4.11. Les principales étapes du traitement des données sont résumées ci-dessous :

## Chapitre 4. Microscopie multiconfocale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

1. Somme de toutes les sections afin de mener une analyse globale temporelle de tous les corps cellulaires ;
2. Calcul des intensités moyennes de fluorescence pour chacune des images ainsi obtenues ;
3. Modélisation du niveau de fluorescence basal par une fonction exponentielle décroissante en excluant les points correspondant à la stimulation (figure 4.25). La modélisation exponentielle représente le photoblanchiment des sondes fluorescentes ;
4. Calcul de la variation de fluorescence normalisée  $\Delta F/F_0 = \frac{F - F_0}{F_0}$  en réponse à la stimulation où  $F_0$  est la fluorescence à l'état basal, c'est-à-dire en l'absence de stimulation.

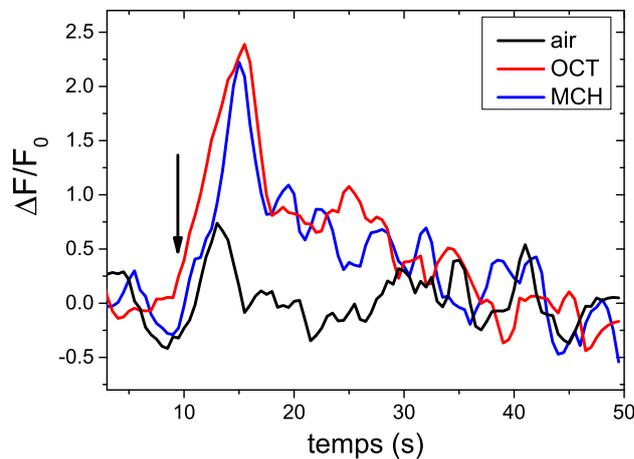


FIGURE 4.26 – Variation de fluorescence  $\Delta F/F_0$  de la sonde G-CaMP6f au cours de stimulations olfactives : octan-3-ol (OCT), 4-méthylcyclohexanol (MCH) et “air contrôle”. La flèche indique l’instant où l’odeur est envoyée.

Les résultats de cette analyse globale sont présentés sur la figure 4.26. On observe des variations de fluorescence d'environ 2% pour les stimulations avec les deux odeurs 4-méthylcyclohexanol et octan-3-ol. Il faut noter que ces pourcentages correspondent à une analyse globale. Or il est connu que seule une faible proportion des neurones des corps pédonculés présentent une réponse neuronale à la stimulation olfactive (environ 20 sur 2000). On s'attend alors à une variation de fluorescence plus importante dans le cas d'une analyse à l'échelle des neurones individuels. La stimulation avec l'air donne une réponse d'environ 0,5% non spécifique de la stimulation olfactive. Ce contrôle permet de s'assurer que les réponses observées pour les stimulations olfactives avec le 4-méthylcyclohexanol et le octan-3-ol ne sont pas de purs artefacts de variations de flux d'air dus à l'actionnement des électrovannes du circuit d'odeur.

## 4.5 Analyse à l'échelle du neurone individuel par bioinformatique

Les résultats présentés dans cette partie sont le fruit du travail de Felipe Delestro, doctorant à l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure de Paris. Son rôle dans le projet est de mettre au point les outils informatiques qui permettent d'identifier chacune des cellules de Kenyon du cerveau de la drosophile. Le nombre de cellules de Kenyon varient dans la littérature, entre 800 et 2900, principalement du fait de la méthode de comptage mise en œuvre : une mauvaise résolution axiale peut conduire à une sous-évaluation du nombre de cellules de Kenyon, alors que l'utilisation de pilotes d'expression non spécifiques des neurones intrinsèques des corps pédonculés peut conduire à une sur-évaluation. Une évaluation récente [28] a dénombré environ 2000 cellules de Kenyon par hémisphère. L'idée de l'étude est de suivre dans le temps l'activité de chacune de ces cellules de Kenyon afin d'identifier les neurones impliqués dans la formation de la mémoire. Les noyaux des corps cellulaires marqués avec la mCherry servent de repères pour la détection afin de venir ensuite lire l'information contenue dans la fluorescence de la voie G-CaMP6f (ou ArcLight), témoin de l'activité neuronale.

### 4.5.1 Compensation du mouvement

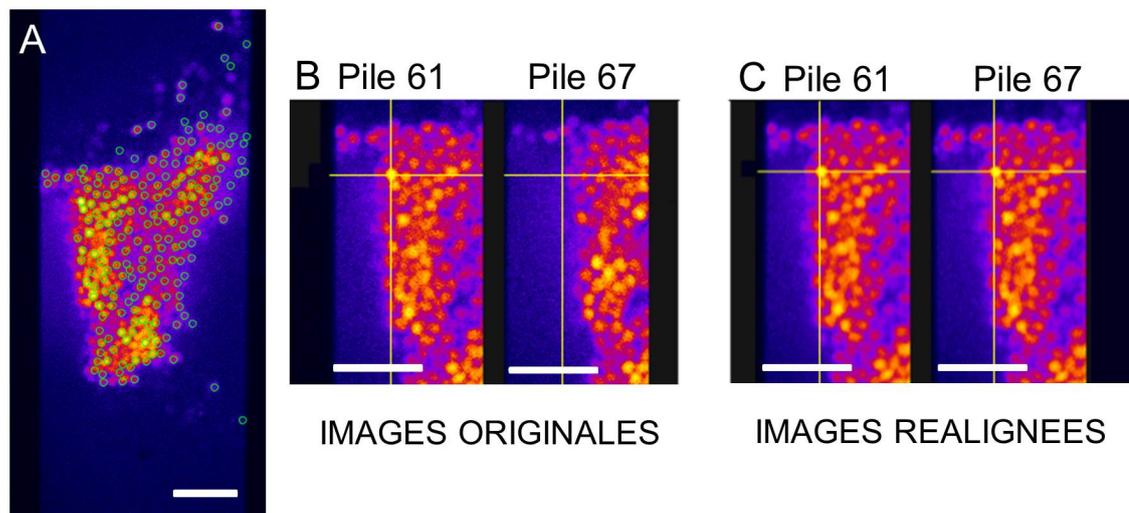


FIGURE 4.27 – Recalage 3D des images entre piles, en raison du mouvement de la drosophile. (A) Définition des noyaux des corps cellulaires utilisés comme points d'ancrage pour le recalage des images. (B) Détail de deux images prises à la même profondeur espacées temporellement de 3 secondes (ce qui correspond à la prise de 6 piles d'images) avant le recalage. (C) Images correspondantes après recalage de la pile numéro 67. Barres d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ .

Une des principales limitations de l'imagerie *in vivo* est le mouvement de l'échantillon. Au cours de l'expérience, la mouche est en vie et ne doit en aucun cas être endormie afin de pouvoir suivre des réponses neuronales à des stimulations. Bien que la mouche soit fixée pour l'imagerie et qu'un gel d'agarose soit utilisé pour diminuer les mouvements du cerveau, des mouvements

résiduels persistent. Afin de corriger ce mouvement, il est donc nécessaire de recalculer toutes les images par rapport à une image de référence. Deux grands types d'algorithmes existent à cet effet :

- les algorithmes dont le critère de ressemblance repose sur un motif d'intensité dans l'image ;
- les algorithmes dont le critère de ressemblance repose sur des attributs géométriques de l'image comme des points ou des lignes [192]. Ce type d'algorithme établit une correspondance entre les images à l'aide d'un nombre discret de points d'ancrage. Ces points sont alors utilisés pour déterminer la transformation à appliquer aux images pour qu'elles correspondent à l'image de référence.

Dans notre cas, l'algorithme de recalage des images basé sur l'intensité n'est pas applicable si le mouvement est trop prononcé. Il peut s'avérer également difficile à mettre en œuvre pour des échantillons dont les sondes présentent trop de photoblanchiment. On privilégiera donc l'utilisation de l'algorithme reposant sur des critères géométriques. La correction n'utilise pas de billes fluorescentes qui auraient été implantées artificiellement dans le cerveau pour servir de repères. On tire ici parti du marquage des noyaux des corps cellulaires avec la protéine fluorescente mCherry. La figure 4.27A illustre la notion de points d'ancrage où quelques noyaux bien définis dans l'image serviront de repères. La détection des points d'ancrage est réalisée de manière automatique. Une transformation affine 3D, corrigeant les mouvements de translation et de rotation, est alors appliquée aux images (extension "Descriptor-based series registration (2d/3d + t) de ImageJ [192]). Les résultats de ce recalage d'images sont présentés sur les figures 4.27B et C. Avant le recalage, les images extraites des piles numérotées 61 et 67 ne sont pas identiques, alors qu'après le recalage les positions des noyaux de l'image de la pile 67 correspondent à celles de l'image de la pile 61. La similitude des images après leur recalage est frappante, démontrant ainsi une compensation efficace du mouvement latéral et axial. Le mouvement global du cerveau est corrigé mais quelques mouvements de déformation peuvent néanmoins subsister. La transformation appliquée est de type rigide car affine. On peut donc l'exprimer sous la forme d'une matrice de transformation. Cela n'aurait pas été le cas si la transformation utilisée avait été de type non-rigide. Cette dernière est certes plus précise car permettant d'évaluer et de corriger les déformations locales, mais non exprimable sous la forme d'une matrice de transformation. Cette matrice de transformation établit une correspondance entre l'image originale et l'image recalée. La possibilité d'exprimer la transformation sous la forme d'une matrice est très importante dans notre cas, car cette matrice va permettre à terme de réaligner de la même manière le signal provenant de la fluorescence de la mCherry et le signal provenant du rapporteur d'activité (G-CaMP6f ou ArcLight).

### 4.5.2 Procédé de détection des corps cellulaires individuels

Afin de détecter de manière efficace les noyaux des neurones de façon individuelle, il est essentiel de garder à l'esprit la réalité de notre échantillon biologique. Il s'agit tout d'abord d'un échantillon vivant et une étape de recalage des images préalable à toute tentative de détection des noyaux est absolument indispensable pour s'affranchir du mouvement (figure 4.27). Le nombre de noyaux à détecter est grand pour pouvoir étudier le centre de la mémorisation de

## Chapitre 4. Microscopie multiconfocale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

la drosophile de manière exhaustive. En effet, 2000 noyaux proches les uns des autres sont empaquetés dans un volume typique de  $70 \times 30 \times 50 \mu\text{m}^3$ . Ces noyaux sont de plus répartis dans les trois dimensions de l'espace conduisant à la présence d'aberrations optiques pour l'imagerie des corps cellulaires les plus profonds. Les noyaux semblent même parfois se toucher du fait de la PSF du microscope (figure 4.22), rendant alors difficile leur détection individuelle. A cela s'ajoute la présence de bruit dans les images. Le bruit dans les images peut provenir de l'autofluorescence du cerveau, mais une part non négligeable peut également être due à une détection non parfaitement confocale de la fluorescence assurée par l'objectif de grandissement  $40\times$ , provenant d'une inadaptation de la taille des trous confocaux des disques de Nipkow. Afin d'assurer la détection de noyaux, parfois non séparés spatialement, dans une image bruitée, des algorithmes spécifiques doivent alors être développés. Comme il sera montré dans la sous-section 4.5.4, l'algorithme de détection proposé par ImageJ (3DOC pour "3D Object Counter") n'est pas suffisamment efficace pour notre projet.

### 4.5.2.1 Première version : Algorithme de seuillage sur l'intensité

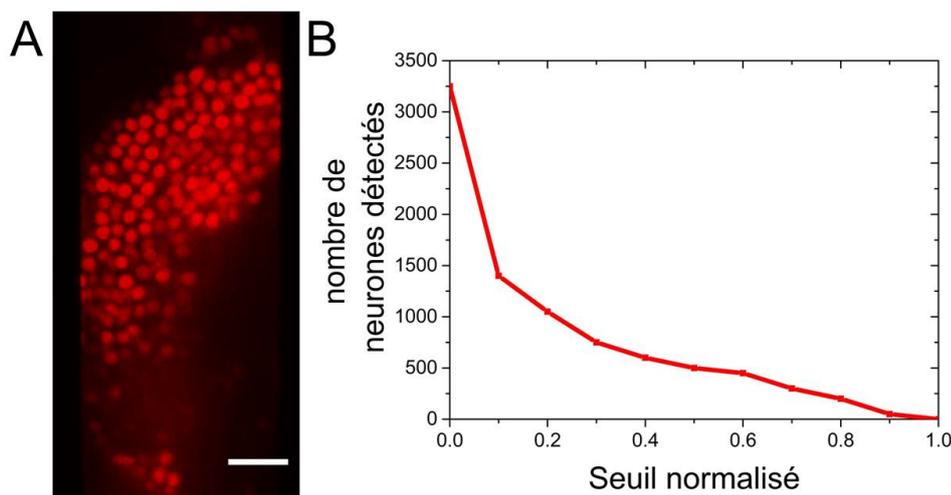


FIGURE 4.28 – Imagerie et détection des noyaux par seuillage d'intensité. (A) Voie d'imagerie rouge mCherry des corps cellulaires d'une drosophile de lignée "mCherry/ArcLight". Barre d'échelle :  $10 \mu\text{m}$ . (B) Evolution du nombre de noyaux détectés en fonction du seuil. Le seuil est normalisé par rapport à l'intensité de fluorescence maximale.

La première étape de l'algorithme de détection consiste à appliquer à l'image un filtre gaussien en trois dimensions, pixel par pixel, afin de "lisser" l'image. Ce filtrage, éliminant les hautes fréquences spatiales, permet de diminuer le bruit. Cette étape est indispensable pour ensuite détecter les maxima locaux d'intensité sans être trop affecté par les fortes variations d'intensité pixel à pixel présentes dans le bruit de fond. Un seuillage sur l'intensité des pixels est ensuite appliqué afin de séparer les noyaux du bruit de fond. Cette approche peut sembler dans un premier temps séduisante de part sa simplicité, mais elle n'est que peu adaptée à notre situation car elle utilise un critère d'intensité que nous avons déjà indiqué comme non adapté pour le recalage des images. En effet, l'intensité de fluorescence des noyaux, pour une même

drosophile, peut varier au cours du temps (photoblanchiment, figure 4.23) ou en profondeur (figure 4.22) ce qui nécessiterait alors d'adapter le seuillage d'intensité à ces deux paramètres. De plus, il faudrait aussi tenir compte de la variabilité entre individus du niveau d'expression des sondes fluorescentes (malgré des conditions d'élevage et d'imagerie standardisées). Les taux de photoblanchiment et d'aberrations optiques sont eux aussi variables entre les individus. Notamment, les aberrations optiques dépendent énormément de l'épaisseur d'agarose et de cerveau traversée par la lumière avant d'atteindre le plan d'imagerie d'intérêt. L'orientation précise de la tête de la drosophile lors de la préparation est donc une étape cruciale pour limiter la variabilité. Ainsi, afin d'identifier de façon identique les neurones d'un individu à l'autre pour pouvoir ensuite étudier leur réponse à des stimuli, il est indispensable de s'affranchir de tout paramètre subjectif pouvant influencer sur la détection. La figure 4.28 montre l'impact de la valeur du seuil, arbitrairement choisi, sur le nombre de neurones détectés. Le nombre de neurones détectés avec cet algorithme de seuillage d'intensité peut varier de 0 à 3250 suivant la valeur du seuil.

### 4.5.2.2 Deuxième version : Algorithme de détection de la forme

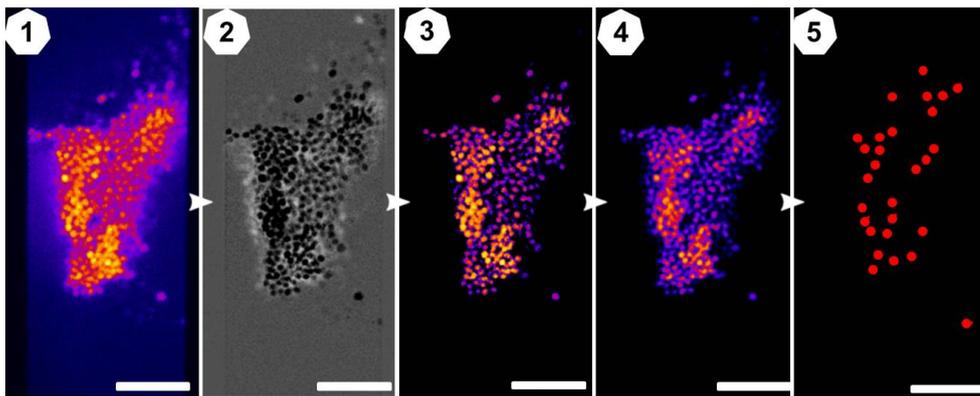


FIGURE 4.29 – Principales étapes de l'algorithme de détection des noyaux. (1) Image originale. (2) Création d'un masque de filtrage grâce au filtre LoG. (3) Filtrage de l'image originale avec le masque présenté en (2). (4) Lissage avec un filtre gaussien. (5) Détection des maxima locaux d'intensité. Barres d'échelle :  $10\mu\text{m}$ .

Afin de s'affranchir de tout paramètre de seuillage d'intensité dans la détection des noyaux des neurones en 3D et au cours du temps, un second algorithme a été développé. Les différentes étapes de cet algorithme sont résumées sur la figure 4.29 :

1. Une interpolation bilinéaire [193] est appliquée dans la direction axiale afin d'obtenir des voxels cubiques. En effet, l'échantillonnage n'est pas le même dans les directions latérale et axiale. Le pas axial est de  $2\mu\text{m}$  alors que chaque pixel dans le plan latéral correspond à une taille de  $160\text{nm}$  (pour l'objectif de grandissement  $40\times$ );
2. L'image est ensuite filtrée avec un filtre LoG (Laplacian of Gaussian filter), consistant en la convolution d'un filtre gaussien et d'un filtre laplacien (dérivée seconde). Le filtre gaussien, de déviation standard correspondant à la taille typique des noyaux, permet

## Chapitre 4. Microscopie multiconfocale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

de diminuer le bruit de l'image, tandis que le filtre laplacien permet de déterminer des variations spatiales rapides d'intensité dans les images, comme par exemple des bords (ce qui explique qu'il soit d'abord nécessaire de lisser le bruit). Des détails concernant ce filtre sont donnés dans l'annexe B ;

3. L'image filtrée obtenue est alors utilisée comme masque sur l'image originale afin de mettre à zéro le fond en dehors des noyaux, et cela sans paramètre de seuillage d'intensité ;
4. L'image est alors à nouveau filtrée avec un filtre gaussien 3D de même déviation standard que le filtre LoG utilisé pour la deuxième étape. Ce filtrage permet de s'assurer que chaque noyau aura un seul maximum local d'intensité en son centre ;
5. La dernière étape consiste alors à détecter en 3D les maxima locaux d'intensité dans l'image avec un rayon de détection correspondant à la taille typique des noyaux.

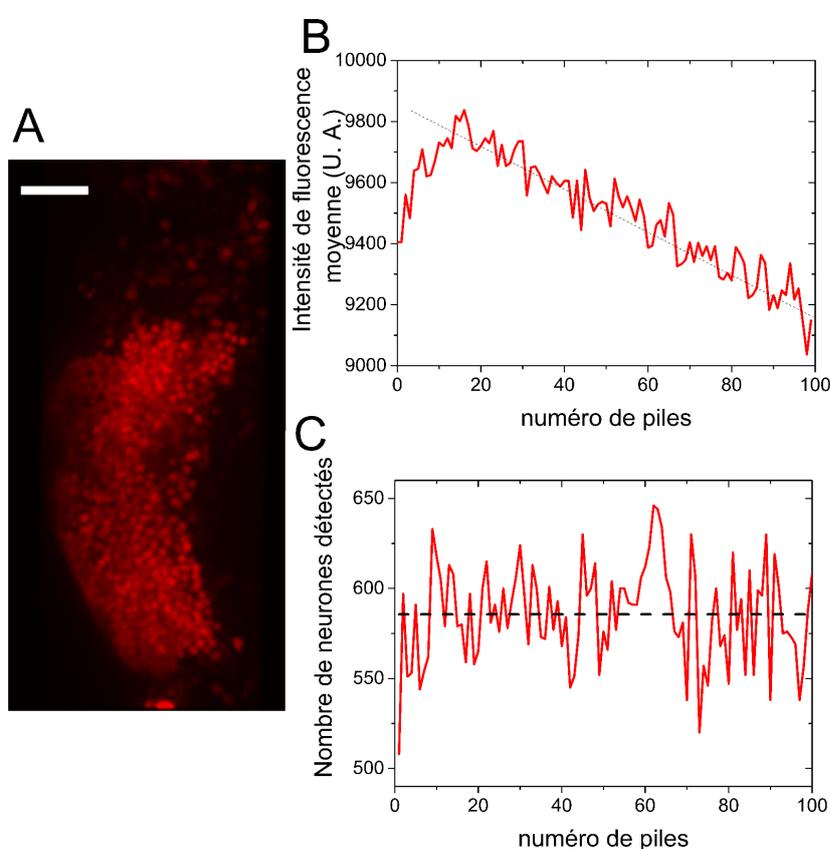


FIGURE 4.30 – (A) Projection maximale sur  $50 \mu\text{m}$  d'épaisseur des images des noyaux marqués à la mCherry. Barre d'échelle :  $10 \mu\text{m}$ . (B) Intensité de fluorescence moyenne de la protéine mCherry exprimée dans la totalité des neurones des corps pédonculés en fonction du numéro de la pile acquise et donc en fonction du temps, montrant le photoblanchiment de la sonde. L'augmentation de la fluorescence au début de l'acquisition a été observée à plusieurs reprises ( $n > 5$ ), mais son origine n'a pas été expliquée. (C) Évolution du nombre de neurones détectés avec l'algorithme sans seuillage d'intensité au cours du temps. Le trait pointillé représente le nombre moyen de neurones détectés. La durée d'acquisition de chaque pile d'images est de  $0.5 \text{ s}$ .

Les coordonnées spatiales tridimensionnelles de chacun des noyaux détectés sont alors obtenues. L'élément clé de cet algorithme est l'absence de paramètre pour la détection, hormis la taille des noyaux qui est précisément connue dans notre cas puisqu'elle est de l'ordre de  $1.5 \mu\text{m}$ . La figure 4.30C représente le nombre de neurones détectés avec cet algorithme de détection en fonction du numéro de la pile d'images, pour une durée totale d'imagerie de cinquante secondes. Aucune tendance à la décroissance du nombre de neurones détectés n'est observée, bien que le phénomène de photoblanchiment se produise (Figure 4.30B). Cet algorithme n'est donc pas sensible au photoblanchiment.

### 4.5.3 Suivi temporel des noyaux

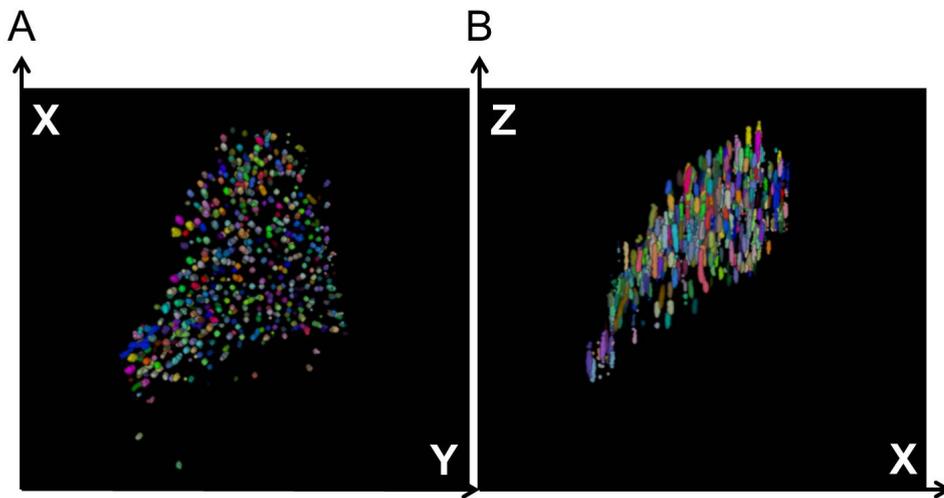


FIGURE 4.31 – Représentation de l'ensemble des positions au cours du temps des maxima des noyaux des cellules de Kenyon. (A) Vue de dessus  $(X, Y)$ . (B) Vue de côté  $(X, Z)$ .

La détection est menée séquentiellement sur chaque pile d'images. Ainsi, les maxima d'intensité détectés pour chaque pile d'images nécessitent d'être reliés entre eux afin de permettre une détection, non plus seulement tridimensionnelle, mais quadridimensionnelle incluant le temps. La détection étant faite sur les images recalées, les variations de position d'un même noyau au cours du temps sont suffisamment faibles pour permettre une représentation de l'espace quadridimensionnel  $(X, Y, Z, t)$  dans un espace tridimensionnel où les détections successives d'un même noyau au cours du temps sont représentés sous la forme d'un groupement (figure 4.31). On constate sur la figure 4.31B, que les groupements sont étirés dans la direction axiale, principalement à cause de la faible précision du recalage des images dans cet axe, dû à un faible échantillonnage. Dans l'idéal, chaque groupement doit correspondre aux positions successives d'un seul et même noyau au cours du temps. Dans la réalité, l'observation est plus complexe. Certains groupements, par exemple, ne contiennent pas toutes les positions temporelles du noyau associé au groupement car certaines détections ont dû échouer.

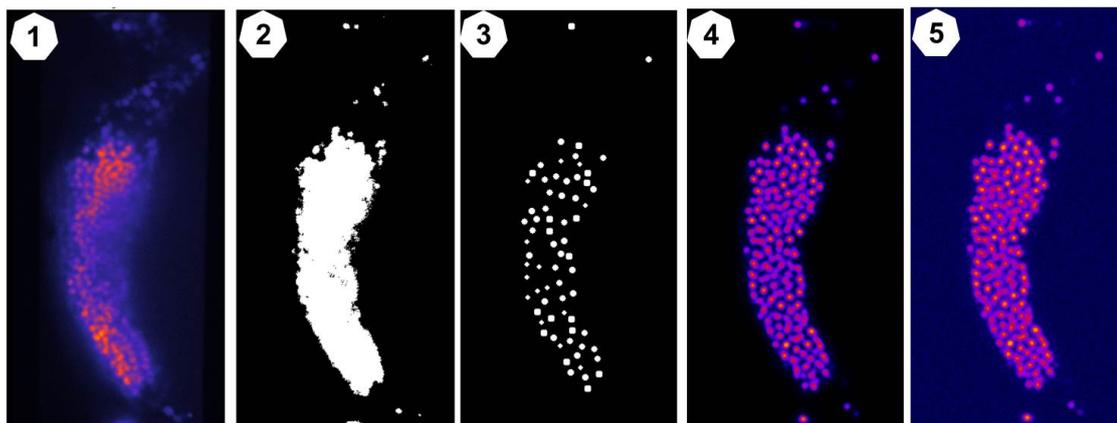


FIGURE 4.32 – Principales étapes de création d’images synthétiques de corps cellulaires de drosophile. (1) Image originale acquise au microscope. (2) Extraction du volume occupé par les noyaux par seuillage d’intensité. (3) Remplissage du volume par des sphères de la taille des noyaux. (4) Convolution avec la PSF du microscope. (5) Ajout du bruit de fond. Remarque : une seule section est représentée.

#### 4.5.4 Test de l’algorithme de détection sur image synthétique

Afin de tester l’efficacité de l’algorithme de détection des noyaux des cellules de Kenyon, l’utilisation d’images artificiellement créées peut se révéler utile. Ces images synthétiques doivent néanmoins refléter la réalité. Les différentes étapes de la création des images synthétiques sont résumées sur la figure 4.32. La première étape consiste à extraire le volume occupé par les noyaux des neurones sur l’image réelle par seuillage d’intensité. Une fois ce volume extrait, 2000 sphères de taille correspondant à celle des noyaux (typiquement  $1.5 \mu\text{m}$  de diamètre) sont distribuées le plus loin possible les unes des autres dans ce volume. Pour rendre l’image plus proche de nos observations, l’image obtenue est ensuite convoluée par la PSF du microscope déterminée dans la partie 4.2.1.5. Enfin, le même bruit de fond que celui de l’image originale est ajouté pour parfaire l’image synthétique créée. La figure 4.33 représente l’efficacité du programme de détection sur des images synthétiques, où 2000 neurones ont été recréés, en fonction du pas d’imagerie dans la direction axiale. Pour les images idéales, c’est-à-dire dans le cas où l’image n’a pas été convoluée par la PSF, on détecte la totalité des neurones pour un pas d’imagerie inférieur à  $1.5 \mu\text{m}$  qui correspond au diamètre des noyaux des neurones artificiellement créés. Dans le cas où les images artificielles contiennent l’information de la PSF et du bruit, même pour un pas d’imagerie dans la direction axiale infiniment petit, seuls 80 % des neurones sont détectés. Le pas, qui est utilisé dans les expérimentations, est plutôt de  $2 \mu\text{m}$ . Cette valeur d’échantillonnage de l’imagerie dans la direction axiale est largement dictée par les contraintes temporelles du projet : imager rapidement l’ensemble des corps cellulaires répartis dans un volume en 3D. Pour une valeur de  $2 \mu\text{m}$  du pas axial, une efficacité de détection des neurones de 80 % est atteinte. La figure 4.33 montre également l’amélioration de l’efficacité du programme de détection développé en comparaison de la méthode “3D Object Counter” de ImageJ. Pour un pas d’imagerie de  $2 \mu\text{m}$  en profondeur, on passe de 23 % à 80 % d’efficacité de détection. Leur méthode d’analyse est complètement différente : la détection se fait en 2D

puis est extrapolée en 3D en s'aidant des détections dans les plans au dessus et en dessous.

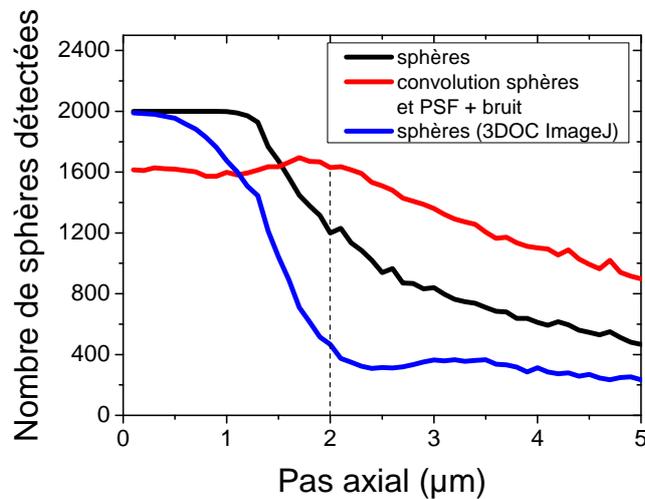


FIGURE 4.33 – Graphique représentant le nombre de noyaux cellulaires détectés, en utilisant le filtre LoG, sur une image synthétique comprenant 2000 noyaux (représentés par une sphère de diamètre  $1.5 \mu\text{m}$ ) en fonction du pas d'imagerie dans la direction axiale. Deux cas sont représentés : détection des sphères sans prendre en compte la PSF et le bruit (noir), et détection des sphères convoluées avec la PSF du microscope et assorties de bruit (rouge). La courbe bleue correspond à une détection menée avec le programme "3D Object Counter" de ImageJ et non avec le programme de détection développé. Le trait pointillé représente le pas axial typiquement utilisé dans le protocole d'imagerie.

#### 4.5.5 Perspectives : Quantification du signal du rapporteur fluorescent d'activité neuronale à l'échelle du neurone individuel

Une fois les images recalées pour s'affranchir du mouvement, les noyaux marqués à la mCherry détectés, la dernière étape consiste alors à récupérer l'information de la seconde voie spectrale d'imagerie, à savoir l'information contenue dans les variations de fluorescence de la sonde calcique G-CaMP6f par exemple. Ces variations de fluorescence, témoin de l'activité neuronale, doivent être étudiées non à l'échelle globale mais à l'échelle du neurone individuel. Il faudra définir une coquille 3D autour du noyau, correspondant au cytoplasme du neurone correspondant, et étudier la variation de fluorescence de la sonde au cours du temps, en 3D, et cela pour les 2000 neurones composant les cellules de Kenyon. Une fois le profil individuel de fluorescence déterminé pour chaque neurone, les données seront analysées sous forme matricielle. Chaque ligne correspondra à l'un des 2000 neurones et les colonnes représenteront l'évolution temporelle. Dans cette matrice sera alors contenue toute l'information de l'activité neuronale lors d'un évènement de mémorisation par exemple. Le projet est ambitieux et les défis sont encore nombreux :

- l'algorithme de détection doit être amélioré pour pouvoir détecter la totalité des neurones au cours du temps ;

## Chapitre 4. Microscopie multiconfocale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

---

- le système de stimulation {odeur + chocs} doit être validé comme étant capable de conditionnement olfactif aversif;
- une statistique suffisante de drosophiles doit être obtenue pour en conclure un “modèle d'apprentissage”.

### 4.6 Discussion

#### 4.6.1 Imagerie tridimensionnelle *in vivo* d'un réseau neuronal entier, résolue à l'échelle du neurone individuel

Le but de l'étude qui a été présentée dans ce chapitre concerne l'imagerie de l'ensemble des neurones des corps pédonculés à l'échelle du neurone individuel. Même si ce projet n'est encore qu'à l'étape de développement, cette approche multi-échelle massive est assez novatrice, et a pour objectif à long terme de comprendre l'encodage d'un souvenir au niveau du réseau de neurones, pour deux types de conditionnement : aversif et appétitif. L'implémentation d'une cellule de conditionnement sous le microscope, une imagerie optique appropriée et un traitement informatique sophistiqué doivent permettre de mener à bien ce projet. Des expériences d'imagerie morphologique ont été menées pour vérifier que le système de microscopie est approprié à la problématique biologique (figures 4.16 et 4.17), et détecter les éventuelles difficultés. Des expériences préliminaires d'imagerie fonctionnelle ont également été réalisées (figures 4.24 et 4.26). Les deux types de stimuli qui ont été testés sont ceux qui constituent le paradigme du conditionnement associatif olfactif aversif le plus couramment utilisé chez la drosophile mettant en jeu des stimulations olfactives et électriques. Dans la littérature [177, 194, 195], la réponse à des stimulations olfactives chez la drosophile a été largement étudiée au niveau des glomérules des lobes antennaires (voir figure 1.3B du Chapitre 1 pour l'anatomie du cerveau de la drosophile), et dans une moindre mesure au niveau des corps pédonculés. La compréhension du codage de l'information olfactive au niveau des corps pédonculés est difficile du fait de la non reproductibilité de positionnement des corps cellulaires des neurones d'un individu à l'autre. Les études existantes, réalisées au niveau des corps cellulaires des neurones des corps pédonculés, n'ont permis de suivre simultanément qu'une fraction de ceux-ci : 3.5% en surface [196], 5% en imageant un seul plan [51, 52], 30% en imageant trois plans séparés de 7  $\mu\text{m}$  en profondeur [197].

Il a été démontré, par électrophysiologie [27] et par mesure optique en utilisant des rapporteurs d'activité calcique tels que G-CaMP [183], que la réponse à une stimulation olfactive apparaît de façon éparse dans une faible fraction des corps cellulaires du fait d'une inhibition GABAergique [184]. Seulement  $\approx 5\%$  des neurones sont activés par ce type de stimulation. Cependant, ce pourcentage a été déterminé en ne considérant qu'une très petite population de neurones. Typiquement, seules 71 cellules de Kenyon sur les 2000 que comptent les corps pédonculés ont été analysées avec la méthode électrophysiologique [27]. Ce codage éparé de l'information olfactive au niveau des corps pédonculés suggère que le nombre de neurones du réseau participant effectivement à l'évènement de mémorisation est très faible. Si un sous-ensemble de neurones a effectivement stocké l'association du stimulus inconditionnel

## Chapitre 4. Microscopie multiconfocale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

---

(chocs électriques, dans le cas d'un protocole aversif) et du stimulus conditionnel (odeur), on s'attend à observer un changement de leur réponse vis à vis du stimulus conditionnel avant et après conditionnement : ce phénomène est couramment appelé trace mnésique.

La nature cellulaire d'une trace mnésique est très peu connue. Plus particulièrement, nous ne savons pas si les neurones qui ont stocké l'information de l'association olfactive sont tous ceux qui répondaient initialement à la présentation de l'odeur (associée au stimulus inconditionnel). Nous n'avons pas non plus connaissance si un recrutement de nouveaux neurones, autres que ceux répondant à cette odeur, est nécessaire pour le processus de mémorisation. L'encodage épars au sein des cellules de Kenyon rend impossible la compréhension d'une trace mnésique avec une analyse globale des neurones. Une difficulté supplémentaire est l'absence d'homogénéité des neurones participant à l'évènement de mémorisation : ils ne sont pas nécessairement tous du même type ( $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  ou  $\gamma$ ) : les cellules de Kenyon répondant à une odeur donnée ne sont pas déterminées génétiquement, et sont donc différentes d'une mouche à l'autre. Les approches génétiques traditionnellement utilisées sont alors insuffisantes. Par exemple, au sein des neurones de type  $\alpha/\beta$ , il y a très certainement une hétérogénéité de réponse, mais avec le système d'expression UAS/GAL4, il n'est pas possible de ne marquer génétiquement que les neurones actifs.

Il est cependant envisageable de cibler les neurones participant à la mémorisation en utilisant le fait que, durant la formation de la mémoire, certains gènes sont spécifiquement transcrits. Cette approche n'est toutefois pas applicable pour la mémoire à court terme qui ne nécessite pas de synthèse de nouvelles protéines. Pour obtenir la séquence spatio-temporelle complète de l'évènement de mémorisation, il apparaît donc indispensable d'étudier optiquement individuellement chacun des corps cellulaires des cellules de Kenyon répartis en volume dans le cerveau avec une échelle cellulaire, d'où l'approche d'imagerie tridimensionnelle apportée par la microscopie multiconfocale.

### 4.6.2 L'imagerie de fluorescence multiconfocale et la profondeur

Les approches utilisées traditionnellement dans le domaine de la neurobiologie chez la drosophile sont les microscopies confocale et biphotonique [177, 198]. Ces microscopies classiques permettent typiquement l'acquisition de quelques images par seconde, chaque image correspondant à un plan situé à une position donnée en profondeur dans le cerveau. Pour imager l'ensemble des corps cellulaires environ 25 plans sont nécessaires, ce qui rend impossible le suivi d'une réponse d'une durée de quelques centaines de millisecondes. L'approche optique utilisée ici est un microscope multiconfocal qui permet de paralléliser le balayage de l'échantillon par le faisceau d'excitation, augmentant ainsi la cadence d'acquisition des images. Dans notre cas, la durée minimale d'exposition pour une image ayant la taille maximale du capteur est de 17 ms (la limitation est imposée par la vitesse de rotation des disques de Nipkow). Dans ce type de microscope, la résolution du sectionnement optique est liée aux caractéristiques des disques tournants : espacement entre les micro-lentilles, nombre et taille des trous de filtrage. La détermination de la réponse impulsionnelle du microscope avec les deux objectifs, de faible ( $40\times$ ) et fort grandissement ( $63\times$ ), a montré que le microscope est proche de la limite de diffraction uniquement pour l'objectif de grandissement le plus élevé (figure 4.4 et tableau 4.2). Cet effet provient très probablement du fait que la tête confocale utilisée

## Chapitre 4. Microscopie multiconfocale pour l'imagerie massive *in vivo* à l'échelle du neurone individuel

---

Yogogawa CSUX1-M1N-E, a des trous de filtrage de diamètre  $50\ \mu\text{m}$ . Cette taille est adaptée à celle des micro-lentilles uniquement pour les objectifs de fort grandissement. Ainsi, l'utilisation d'un objectif de plus faible grandissement ( $40\times$ ), qui permet d'imager des échantillons plus étendus, dégrade la confocalité du microscope. Une solution alors est d'utiliser une tête confocale avec des trous plus petits, typiquement de diamètre  $25\ \mu\text{m}$ , mieux adaptés pour les objectifs de microscope de faible grandissement. L'effet de la dégradation du sectionnement optique est d'autant plus visible lorsque l'on image en profondeur dans l'échantillon. On constate sur les images réalisées que les noyaux des corps cellulaires sont parfaitement bien résolus en surface (figure 4.22A) mais en profondeur, le contraste est dégradé (figure 4.22B). En profondeur, en raison de diffusions multiples, des photons provenant de plans hors mise au point peuvent rentrer dans des trous de filtrage voisins de celui de l'excitation ce qui conduit à une augmentation du bruit de fond et à une dégradation de la capacité de coupe optique.

La microscopie de type "spinning disk" n'est peut être pas la meilleure technique pour des considérations de bruit de fond mais dans notre cas l'expression ciblée des sondes fluorescentes (avec le système UAS/GAL4) dans une région bien délimitée du cerveau permet de s'affranchir d'une grande partie du bruit de fond. Cette technique souffre toutefois des mêmes limitations que la microscopie confocale en terme d'absence de confinement de l'excitation au point focal. Cette caractéristique conduit à la création de photons de fluorescence de fond menant à une dégradation du rapport signal à bruit. Cette dégradation de la qualité des images est particulièrement marquée pour les couches les plus profondes du fait de l'absorption et de la diffusion du tissu traversé. La combinaison de la microscopie de fluorescence par excitation à deux photons avec la microscopie multiconfocale pourrait être une approche particulièrement bien adaptée à notre étude.

Cette alliance a déjà été réalisée [199], et a permis d'augmenter le contraste en profondeur en diminuant le bruit de fond dans des échantillons tels que des grains de pollen, ou des embryons de drosophile exprimant la molécule fluorescente GFP. Les trous de filtrage, bien qu'étant moins utiles qu'en microscopie confocale traditionnelle, permettent d'éliminer les photons de fluorescence ayant subi des diffusions multiples dans l'échantillon. La limitation pratique de ce genre de système est la puissance d'excitation laser nécessaire pour obtenir une extension spatiale latérale de la zone imagée non négligeable. Typiquement, en utilisant des lasers impulsionsnels à leur pleine puissance, l'absorption simultanée de deux photons est permise sur une zone d'environ  $40\ \mu\text{m}$  de diamètre dans le cas d'un animal exprimant la GFP [199]. Cette situation est encore plus dramatique pour l'excitation des molécules émettant dans le rouge, comme la protéine mCherry, car les lasers impulsionsnels actuellement disponibles ont une puissance de sortie bien plus faible pour des longueurs d'onde d'excitation comprises entre 1 et  $1.2\ \mu\text{m}$ .

Une autre solution pour améliorer l'imagerie multiconfocale en profondeur est l'utilisation de l'optique adaptative afin de corriger les aberrations optiques introduites par l'échantillon. Une telle combinaison a été développée très récemment [200] : une schématisation du dispositif réalisé est présentée sur la figure 4.34. Les auteurs ont utilisé un échantillon modèle épais

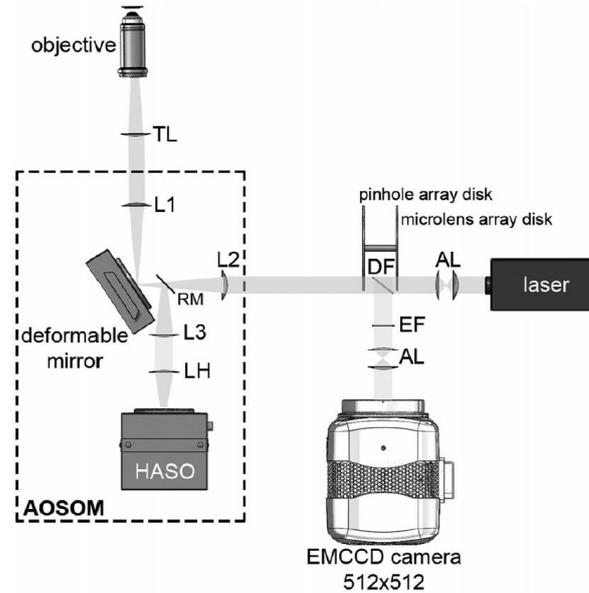


FIGURE 4.34 – Schématisation du dispositif optique alliant microscopie multicon focale et optique adaptative. TL : lentille de tube; HASO : mesureur de front d'onde de type Shack-Hartmann; RM : miroir rétractable; AL : lentilles afocales; DF : miroir dichroïque, EF : filtre d'émission. Cette figure est extraite de [200]. Comme dans notre propre implémentation de l'optique adaptative (présentée au Chapitre 3), le mesureur de front d'onde n'est utilisé que pour créer la matrice de commande nécessaire au pilotage du miroir déformable et pour corriger les aberrations statiques du dispositif optique.

constitué de billes de taille nanométrique dispersées dans un gel d'agarose pour déterminer la dépendance des aberrations sphérique et de coma en fonction de la profondeur. Ils ont estimé une dépendance linéaire de ces deux aberrations avec la profondeur. Ils ont ensuite imagé des échantillons biologiques, tels que des cellules ou des cerveaux *ex vivo* de drosophile, en réadaptant la correction tous les 3 à 5  $\mu\text{m}$  de profondeur avec la calibration de variation linéaire des aberrations préalablement réalisée. La cartographie tridimensionnelle des aberrations d'un échantillon biologique peut être très complexe si bien que cette approche assez simple ne permet pas d'obtenir une correction optimale, mais elle apporte malgré tout une amélioration significative du rapport signal sur bruit et du contraste. Elle présente de plus l'avantage de ne pas nécessiter d'illuminer l'échantillon pour mesurer le front d'onde (afin de corriger les aberrations), ce qui permet de réduire le photoblanchiment et la phototoxicité. Dans leur expérience, l'aberration sphérique est dominante (du fait de l'utilisation d'un objectif à immersion à huile pour imagier des échantillons dont l'indice de réfraction est proche de celui de l'eau). La profondeur maximale à laquelle les auteurs sont parvenus à corriger les aberrations est de 20  $\mu\text{m}$ , ce qui est cohérent avec le fait que pour des plus grandes profondeurs, le contenu en aberrations ne se limite pas à l'aberration sphérique et à l'aberration de coma (Chapitre 3). D'ailleurs dans notre étude, l'aberration sphérique est déjà réduite par l'utilisation d'un objectif de microscope à immersion à eau, compatible avec les expérimentations *in vivo*.

### 4.6.3 Algorithme de traitement des images dédié à l'imagerie du réseau mnésique

Imager l'ensemble des neurones des corps pédonculés est un défi qui ne peut être relevé sans un traitement d'images spécifiquement conçu pour cette application. La difficulté réside dans la détection individuelle des 2000 noyaux des neurones et leur suivi au cours du temps. Une complication inhérente à l'imagerie *in vivo* est le mouvement de l'échantillon. Bien que la préparation de la drosophile pour l'imagerie soit optimisée de manière à limiter la majorité des mouvements du cerveau de grande amplitude, il subsiste des mouvements qu'il est nécessaire de corriger pour un suivi des neurones à l'échelle cellulaire. Une fois les images recalées, un algorithme basé sur la reconnaissance de forme a été développé par F. Delestro à l'École Nationale Supérieure de Paris, afin de détecter les noyaux des neurones. Cet algorithme nécessite encore d'être optimisé car en l'état actuel, il permet la détection d'environ 600 noyaux sur les 2000 que comptent les corps pédonculés ce qui correspond à une efficacité de détection de 30% (figure 4.30C). Il n'est pas encore établi si la limitation provient de la qualité des images de fluorescence, notamment de sa dégradation en profondeur ou de l'échantillonnage axial utilisé, ou de l'algorithme de détection lui-même. Des images synthétiques ont été créées afin de tester l'efficacité du programme de détection. Ces tests montrent qu'une efficacité de détection de 100% ne serait atteinte qu'à deux conditions : (i) disposer d'un microscope idéal, dont la résolution ne soit pas limitée par la diffraction, c'est-à-dire avec une fonction d'étalement du point infiniment petite, et (ii) avoir un échantillonnage dans la direction axiale inférieur à  $1 \mu\text{m}$ . En prenant la PSF en compte, on obtient une efficacité de détection maximale égale à 80% pour un échantillonnage axial de l'imagerie inférieur à  $2 \mu\text{m}$ . Les piles d'images dans le cerveau de la drosophile ont été réalisées avec ce pas et pourtant l'efficacité de détection n'est que de 30% contre les 80% attendus. Néanmoins, les images synthétiques ont été créées par convolution avec une fonction d'étalement du point déterminée à partir d'un échantillon mince de billes fluorescentes (figure 4.4) et non dans le cerveau de la drosophile. Ainsi, l'information prise en compte dans la PSF est majoritairement celle des aberrations du système optique et non celles introduites par le cerveau. Le modèle pourrait être un peu raffiné en déterminant la PSF dans un échantillon d'agarose épais. Même avec cette amélioration, il sera impossible de produire des images synthétiques reproduisant parfaitement la réalité biologique notamment du fait des variations spatiales complexes de l'indice de réfraction au sein du cerveau. On pourrait néanmoins imaginer de laisser pénétrer des nanoparticules fluorescentes (nanodiamant ou "quantum dot") en profondeur dans le cerveau. Cette approche fonctionne dans le cas de tranches d'hippocampe de souris jusqu'à une profondeur d'au moins  $100 \mu\text{m}$  [201]. Les nanoparticules fluorescentes serviraient alors d'"étoiles guides" pour cartographier les aberrations dans le cerveau. Une fois cette cartographie connue, des procédés de déconvolution des images post-acquisition seraient utilisables. En microscopie, l'image observée est la convolution de l'objet avec la fonction d'étalement du point du microscope. La déconvolution consiste à s'affranchir de l'effet de la PSF sur les images. Toutefois, la qualité de l'image déconvoluée dépend de l'adéquation de la PSF utilisée pour la déconvolution avec la réalité. Dans les cas où la fonction d'étalement du point ne peut pas être modélisée ou déterminée avec précision, l'approche de déconvolution n'est pas appropriée et conduit à des reconstructions souffrant d'artefacts [87].

## 4.7 Conclusion

Dans ce chapitre, j'ai présenté un projet visant à décoder un événement de mémorisation au sein du réseau neuronal formé par les cellules de Kenyon avec une échelle cellulaire. Ce projet est très pluridisciplinaire, faisant appel aux neurosciences, à l'ingénierie génétique, à l'imagerie optique et au traitement informatique des images. Concernant l'imagerie, le dispositif de microscopie multiconfocale semble être adapté en terme de sensibilité, de rapidité et de photoblanchiment, bien que la qualité de l'imagerie en profondeur soit dégradée du fait des aberrations. L'algorithme de détection doit être optimisé pour augmenter son efficacité de détection. Lorsque la technologie {protocole d'imagerie + algorithme de détection} sera prête, de nombreuses questions biologiques d'intérêt pourront alors trouver une réponse encore inaccessible aujourd'hui.

# 5

## Électrophysiologie optique alliant imagerie HiLo haute cadence et biosenseurs fluorescents ultra-rapides

### Sommaire

---

5.1	Matériel et méthodes . . . . .	165
5.1.1	Imagerie optique synchronisée à haute cadence . . . . .	165
5.1.1.1	Le dispositif de microscopie . . . . .	165
5.1.1.2	La synchronisation par générateur de fonction . . . . .	166
5.1.2	Le dispositif pour délivrer la stimulation . . . . .	168
5.1.2.1	Le développement de la cellule environnementale . . . . .	168
5.1.2.2	Le boîtier de stimulation . . . . .	168
5.1.2.3	La mise en place précise des électrodes . . . . .	170
5.1.3	Préparation biologique : Génétique et protocole pharmacologique . . . . .	170
5.1.3.1	Les lignées transgéniques . . . . .	170
5.1.3.2	Standardisation de l'expérience . . . . .	171
5.1.3.3	Effet de la molécule de thapsigargine sur les réserves calciques . . . . .	172
5.1.4	Traitement informatique des données . . . . .	174
5.1.4.1	Protocole de traitement pour le moyennage de signaux . . . . .	174
5.1.4.2	Réalignement spatial latéral des piles d'images . . . . .	174
5.1.4.3	Création de cartographies HiLo de réponse aux chocs élec- triques en utilisant la sonde voltage ArcLight . . . . .	175
5.1.4.4	Analyse statistique . . . . .	180

**Chapitre 5. Électrophysiologie optique alliant imagerie HiLo haute cadence et biosenseurs fluorescents ultra-rapides**

---

5.2	Résultats : Comparaison des sondes fluorescentes calcique G-CaMP6f et voltage ArcLight . . . . .	<b>180</b>
5.2.1	Caractéristiques physiques . . . . .	180
5.2.1.1	Brillance . . . . .	180
5.2.1.2	Temps caractéristiques de réponse . . . . .	180
5.2.2	Étude de processus physiologiques : Sensibilisation voltage et désensibilisation calcique . . . . .	183
5.3	Résultats : Exploration, avec la sonde voltage ArcLight, du rôle des neurones GABAergiques et dopaminergiques. . . . .	<b>188</b>
5.3.1	Étude du rôle du récepteur GABA <sub>A</sub> dans la réponse aux chocs électriques	189
5.3.2	Étude du rôle du récepteur dopaminergique DAMB dans la réponse aux chocs électriques . . . . .	191
5.4	Résultats préliminaires : Cartographie spatiale de la réponse aux chocs électriques dans le lobe $\alpha$ . . . . .	<b>194</b>
5.4.1	Microscopie HiLo pour l'étude locale de la réponse des neurones au niveau de leurs projections axonales . . . . .	194
5.4.2	Évolution des taux d'excitation et d'inhibition au cours des stimulations	196
5.4.3	Colocalisation des pixels excités et inhibés . . . . .	199
5.5	Discussion . . . . .	<b>200</b>
5.5.1	Positionnement des temps de réponse mesurés des sondes G-CaMP6f et ArcLight par rapport aux autres systèmes . . . . .	200
5.5.2	Signaux physiologiques <i>in vivo</i> et sonde calcique G-CaMP6f . . . . .	201
5.5.3	Sonde voltage ArcLight et analyse moléculaire . . . . .	203
5.5.4	Cartographie spatiale <i>in vivo</i> de la réponse aux chocs électriques . . . . .	203
5.5.5	Microscopie optique et électrophysiologie <i>in vivo</i> . . . . .	204
5.6	Conclusion . . . . .	<b>206</b>

---

Dans ce chapitre, nous présenterons une expérience combinant la microscopie HiLo, rapide et capable de sectionnement optique, et l'emploi de sondes fluorescentes encodées génétiquement, de nouvelle génération, présentant des temps de réponse courts. Cette approche permet de sonder *in vivo* l'activité cérébrale à l'échelle moléculaire. J'expliquerai tout d'abord les outils développés au cours de cette thèse pour mener à bien ce projet, à savoir le dispositif de microscopie optique synchronisé à haute cadence, l'optimisation du dispositif de stimulation, les lignées transgéniques de drosophiles utilisées, ainsi que le développement de programmes informatiques sur la plate-forme Matlab pour le traitement *a posteriori* des images. Je présenterai ensuite les résultats obtenus concernant la caractérisation comparative de deux sondes fluorescentes fonctionnelles encodées génétiquement, G-CaMP6f et ArcLight, ainsi que leur utilisation pour des études de voies de signalisation moléculaire. Je finirai en présentant des résultats préliminaires de cartographie spatiale *in vivo* de réponse à un stimulus électrique au niveau de la branche axonale  $\alpha$  des neurones de type  $\alpha/\beta$ .

## 5.1 Matériel et méthodes

Dans cette section, nous décrivons les dispositifs mis en œuvre pour tirer profit de la rapidité des sondes fluorescentes encodées génétiquement de dernière génération, afin de cartographier l'activité des neurones du lobe  $\alpha$  en réponse à un choc électrique.

### 5.1.1 Imagerie optique synchronisée à haute cadence

#### 5.1.1.1 Le dispositif de microscopie

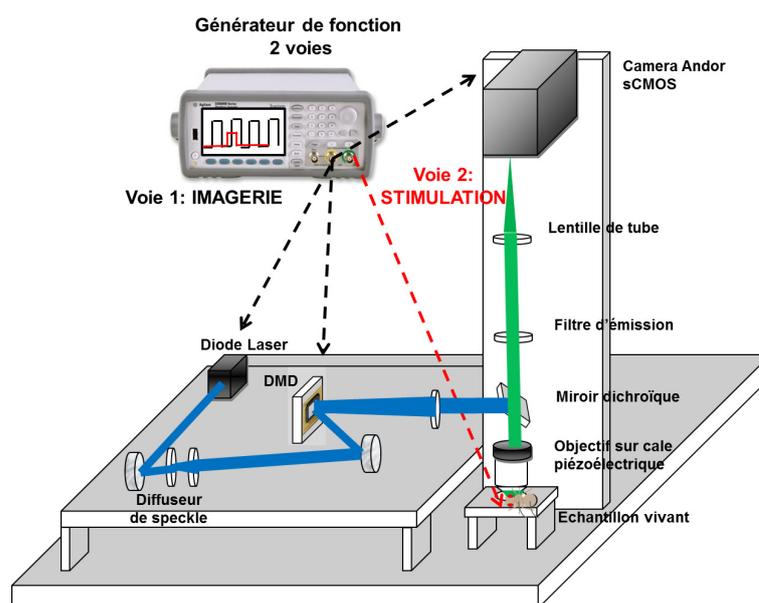


FIGURE 5.1 – Dispositif de microscopie de fluorescence à illumination structurée. En bleu, le faisceau laser d'excitation des senseurs protéiques fluorescents. En vert, la voie d'émission de la fluorescence. DMD : matrice de micromiroirs permettant de structurer l'intensité du faisceau d'excitation. Le générateur de fonction synchronise l'imagerie et le stimulus. Le schéma n'est pas à l'échelle.

Le dispositif utilisé est celui qui a été présenté en détail au Chapitre 2 et qui est reproduit sur la figure 5.1. Il s'agit d'un microscope plein champ où la structuration de l'illumination permet de réaliser en surface, sans correction des aberrations, un sectionnement optique avec une profondeur de champ d'environ  $2 \mu\text{m}$  (pour une fréquence de grille valant environ  $0.3f_0$ , où  $f_0$  est la fréquence de coupure du microscope). Cette capacité de coupe optique est comparable à la microscopie confocale à balayage mais avec l'avantage de la rapidité de la microscopie plein champ. Le faisceau d'excitation est structuré grâce à une matrice de micro-miroirs qui permet d'alterner très rapidement les différents motifs à projeter sur l'échantillon. Le motif utilisé dans cette étude est le plus souvent une mire rectangulaire. Sa période spatiale est typiquement de  $3 \mu\text{m}$  dans le plan de l'échantillon, ce qui est bien plus grand que le critère de Rayleigh défini dans la section 2.1.1.1 du Chapitre 2. Les motifs utilisés pour la microscopie HiLo dans ce chapitre sont montrés à la figure 5.2. Ils permettent l'acquisition des images avec les deux

types d'illumination tout en diminuant la zone de l'échantillon exposée au laser, permettant ainsi de diminuer les effets de photoblanchiment, de phototoxicité et l'émission de fluorescence hors plan de mise au point. La source lumineuse utilisée est un laser émettant à la longueur d'onde de 488 nm. Il permet d'exciter la fluorescence des différentes sondes fonctionnelles encodées génétiquement que j'ai utilisées dans cette étude : la sonde calcique G-CaMP6f et la sonde voltage ArcLight. L'émission de fluorescence est collectée par un objectif de microscope à immersion à eau, ouvert à 0.95 (donnée constructeur), et de grandissement 25 (Leica HC Fluotar L 25×/0.95 ON W VISIR, immersion à eau). La fluorescence est ensuite sélectionnée grâce à un filtre d'émission passe-bande centré sur la longueur d'onde de 525 nm et de largeur spectrale 39 nm, et imagée par une lentille de tube de distance focale 200 mm sur la surface photosensible d'un capteur matriciel sCMOS.

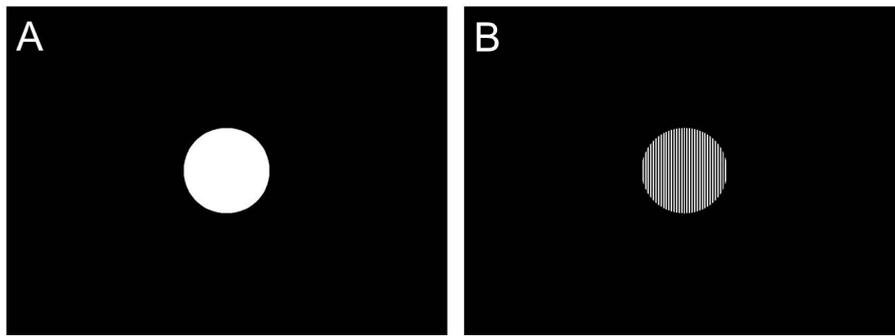


FIGURE 5.2 – Motifs projetés par la matrice de micro-miroirs (DMD) pour la microscopie HiLo. (A) Motif pour l'illumination uniforme et la réduction de l'étendue de l'exposition lumineuse : disque de rayon 100 micro-miroirs en mode "ON", le reste des micro-miroirs est en "OFF". (B) Motif pour l'illumination structurée et la réduction de l'étendue de l'exposition lumineuse : disque de rayon 100 micro-miroirs avec des lignes verticales espacées d'une période de 6 micro-miroirs, le reste des micro-miroirs est en "OFF".

### 5.1.1.2 La synchronisation par générateur de fonction

La prise d'images a été effectuée à une cadence de 100 Hz, soit 10 ms de temps d'exposition pour les expériences où le dispositif a été utilisé en tant que microscope plein champ conventionnel, et 5 ms de temps d'exposition pour les expériences où deux images ont été prises successivement avec une illumination uniforme traditionnelle et une illumination structurée. La caméra, Andor Neo 5.5 sCMOS, permet une fréquence maximale d'acquisition de 716 Hz pour une image de 128 par 128 pixels, ce qui correspond au champ que j'ai imagé. L'imagerie et la stimulation de type électrique ont été synchronisées très précisément grâce à un générateur de fonction à deux voies (Keysight technologies, 33522B Waveform Generator). Les temps de montée et de descente des signaux délivrés par le générateur de fonction sont estimés à 8 nanosecondes (donnée constructeur). La première voie contrôle, à l'aide de signaux digitaux TTL (Transistor Transistor Logic) à 100 Hz, le déclenchement de l'illumination laser, de la projection des motifs par la matrice de micro-miroirs et de la prise d'images par le capteur sCMOS, tous trois mis en mode esclave. La voie 2 permet, grâce à un signal rectangulaire

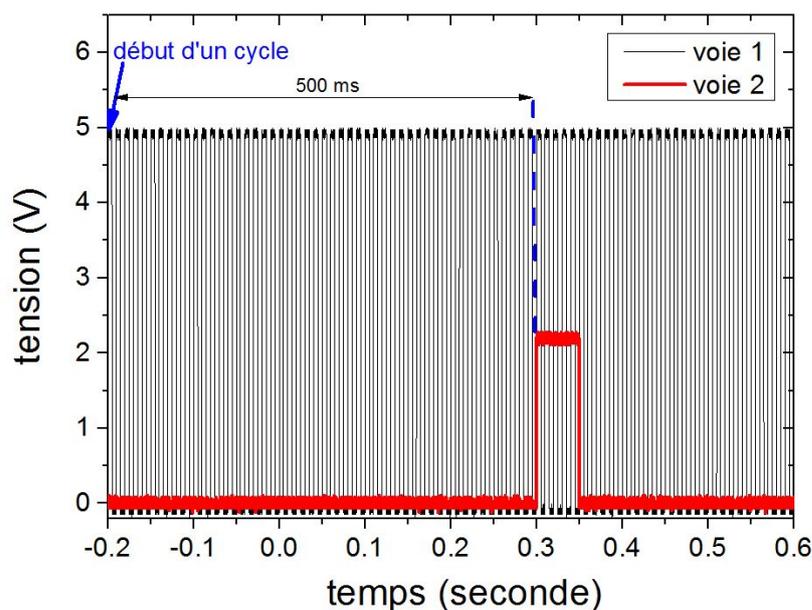


FIGURE 5.3 – Signaux de synchronisation délivrés par le générateur de fonction à deux voies enregistrés à l’oscilloscope. La voie 1 déclenche simultanément, à l’aide d’un signal TTL (0-5 V) de fréquence 100 Hz, l’illumination laser, la mise en forme de l’intensité du faisceau avec la matrice de micro-miroirs et l’acquisition de l’image en fluorescence par le capteur sCMOS. La voie 2 est le signal contrôlant la stimulation (ici de durée 50 ms et d’amplitude 2.2 V). Sur ce graphique, un seul créneau de stimulation est représenté mais, au cours d’une expérience typique, 50 stimulations sont délivrées avec une fréquence de 0.5 Hz (c’est-à-dire une stimulation toutes les deux secondes).

analogique, de délivrer avec une grande précision temporelle une stimulation électrique d’une durée et d’une amplitude donnée au cours du cycle d’imagerie. La figure 5.3 représente les signaux du générateur de fonction correspondant à une portion d’un cycle d’imagerie qui, dans sa totalité, comprend 200 images de 10 ms chacune soit une durée d’acquisition de deux secondes, avec l’envoi de la stimulation une demi-seconde après le début du cycle d’imagerie. Ce cycle est ensuite répété cinquante fois sans interruption afin d’en tirer une réponse physiologique moyennée avec un bon rapport signal sur bruit. Une synchronisation parfaite à haute cadence de la totalité de l’expérience est donc nécessaire. La stimulation choisie est de type électrique car il s’agit de l’un des deux stimuli utilisés lors des conditionnements conventionnels de type associatif olfactif aversif chez la drosophile [25, 202]. L’avantage de ce type de stimulation est la capacité de la déclencher de manière très précise sans délai significatif, ce qui n’est pas le cas par exemple des stimulations olfactives où un délai peut être généré, par la propagation du flux d’odeur dans les tuyaux, entre le déclenchement de la stimulation et l’instant où la drosophile la perçoit. La durée et l’intensité de la stimulation électrique peuvent également être contrôlées avec une grande précision. De plus, des études récentes ont prouvé l’existence d’une réponse des neurones des corps pédonculés à une stimulation de type électrique [191].

## 5.1.2 Le dispositif pour délivrer la stimulation

### 5.1.2.1 Le développement de la cellule environnementale

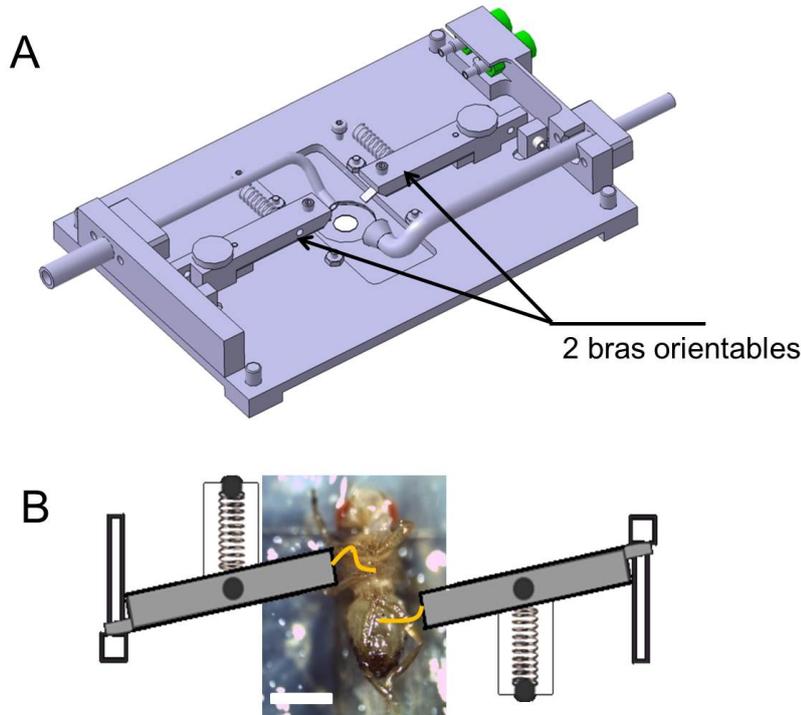


FIGURE 5.4 – (A) Vue globale de la cellule. (B) Détail du dispositif pour la stimulation électrique. Les bras supportant les électrodes peuvent être ajustés en hauteur et en position latérale. La barre d'échelle sur la photographie correspond à  $500 \mu\text{m}$  mais les deux bras ne sont pas à l'échelle par rapport à la drosophile.

Afin de délivrer de manière reproductible la stimulation électrique aux drosophiles, nous avons testé différentes configurations. La solution retenue est celle d'une cellule avec deux bras indépendants (voir la figure 5.4) qui peuvent soit pivoter autour d'un axe vertical, soit être ajustés en hauteur à l'aide de vis micrométriques. Sur chacun des bras, nous avons fixé une électrode constituée d'un fil de platine iridium de diamètre  $250 \mu\text{m}$ . Le platine iridium présente l'intérêt d'être solide mais relativement maniable et d'être également inerte chimiquement en étant notamment résistant à l'oxydation. La drosophile est placée dans la cellule, entre ces deux bras qui permettront de positionner les électrodes. La configuration des électrodes sera précisée dans la section 5.1.2.3.

### 5.1.2.2 Le boîtier de stimulation

La stimulation électrique est délivrée grâce à un boîtier qui a été développé par le service d'électronique du laboratoire Aimé Cotton. Il s'agit d'un montage électronique basé sur un amplificateur opérationnel utilisé en tant que convertisseur tension-courant, qui peut délivrer un courant allant de 0 à  $100 \mu\text{A}$ . Le schéma de principe de ce montage est représenté sur

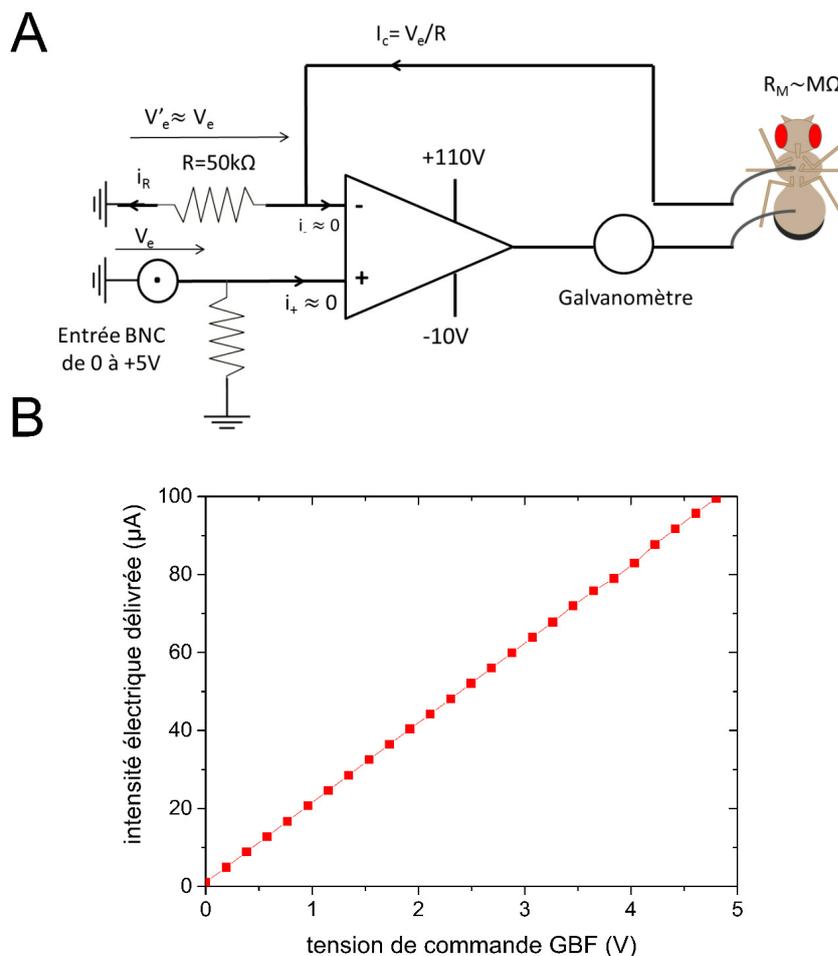


FIGURE 5.5 – (A) Schéma du circuit électronique du boîtier de stimulation basé sur un amplificateur opérationnel utilisé comme convertisseur tension-courant. La tension d'entrée  $V_e$  est fournie par la voie 2 du générateur de fonction. L'amplificateur opérationnel est alimenté en +110 V et -10 V. Les courants de polarisation sont notés  $i_+$  et  $i_-$ . La résistance de la drosophile est notée  $R_M$ . (B) Courbe de calibration donnant l'intensité électrique effective qui traverse le corps de la drosophile (en  $\mu A$ ) en fonction de la tension de commande de la voie 2 du générateur de fonction. La calibration a été réalisée avec une mouche entre les électrodes.

la figure 5.5A. L'amplificateur opérationnel est un composant électronique à trois bornes actives comprenant deux entrées, appelées entrée inverseuse (entrée -) et entrée non-inverseuse (entrée +) et une sortie. Il est alimenté par des sources de tensions continues de +110 V et -10 V. Dans le cas d'un amplificateur opérationnel idéal, les courants de polarisation, notés  $i_+$  et  $i_-$  sur le schéma, sont nuls. Pour notre modèle d'amplificateur opérationnel, APEX PA78, le courant  $i_-$  vaut typiquement 12 pA ce qui reste négligeable ici car la gamme d'intensité utile est de l'ordre du microampère. L'amplificateur opérationnel est câblé en montage amplificateur non inverseur. La boucle de contre-réaction (entrée -) est composée du corps de la drosophile de résistance  $R_M$  ( $R_M$  est typiquement de l'ordre de quelques centaines de kΩ jusqu'au MΩ) et d'un galvanomètre (de résistance 1750 Ω). Dans ce montage, la tension d'entrée sur l'en-

trée + se retrouve intégralement sur l'entrée - et elle impose donc le courant de boucle par la relation d'Ohm. On a alors  $I_C = \frac{V_e}{R}$ . Le courant qui circule à travers le corps de la mouche est donc indépendant de sa résistance  $R_M$  tant que le produit  $R_M \times I_C$  reste inférieur à la tension d'alimentation de l'amplificateur, soit pour  $R_M = 1 \text{ M}\Omega$ ,  $I_C \leq 100 \text{ }\mu\text{A}$ . La résistance  $R$  a été choisie de telle sorte à obtenir une intensité maximale de  $100 \text{ }\mu\text{A}$  lorsque la tension de commande du générateur de fonction est  $5 \text{ V}$ , ce qui évite par ailleurs la saturation de la tension de sortie de l'amplificateur pour une mouche de résistance typique. Le montage est donc un générateur de courant stabilisé contrôlé par une tension. Le galvanomètre, situé dans la boucle de sortie, est un microampèremètre analogique qui permet, par un contrôle visuel aisé, de s'assurer que l'intensité électrique est bien délivrée et donc de vérifier le bon contact des électrodes, qui est un point délicat. La courbe de calibration reliant la tension appliquée par la voie 2 du générateur de fonction et l'intensité électrique effectivement délivrée au niveau du corps de la mouche est donnée sur la figure 5.5B. La réponse  $I_C = f(V_e)$  est parfaitement linéaire.

### 5.1.2.3 La mise en place précise des électrodes

Les électrodes sont positionnées sur le corps de la drosophile comme schématisé sur la figure 5.6C. Le corps de la drosophile ainsi que les électrodes sont préalablement nettoyés à l'acétone de façon à éliminer tout résidu de colle qui pourrait diminuer l'efficacité de la stimulation. Afin de limiter la variabilité des mesures, ces électrodes dont l'extrémité a été affinée mécaniquement, sont placées toujours de la même façon, avec la même polarité sur le corps de la drosophile. L'électrode positive est placée sur le thorax au niveau de la deuxième paire de pattes, la seconde électrode est placée sur l'abdomen de la drosophile. Malgré toutes ces précautions, des variabilités demeurent. Notamment, pour une intensité électrique fixée délivrée sur le corps de la drosophile, l'intensité de la réponse neuronale varie d'une drosophile à l'autre. Pour s'affranchir au maximum de cet effet, certaines normalisations seront effectuées pour l'analyse des résultats présentés ultérieurement.

## 5.1.3 Préparation biologique : Génétique et protocole pharmacologique

### 5.1.3.1 Les lignées transgéniques

Les lignées utilisées dans ce chapitre sont :

- *C739-GAL4,UAS-ArcLight/+*
- *C739-GAL4,UAS-G-CaMP6f/+*
- *C739-GAL4,UAS-ArcLight/+ ; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>*
- *C739-GAL4,UAS-ArcLight/+ ;UAS-RDL<sup>HA</sup>*

Le pilote d'expression *C739-GAL4* permet l'expression du ou des transgènes d'intérêt dans les neurones des corps pédonculés de type  $\alpha/\beta$ . *RDL<sup>HA</sup>* est le cDNA (ADN complémentaire) tagué par HA (Human influenza hemagglutinin) du récepteur GABAergique ionotropique de type A (récepteur  $\text{GABA}_A$ ). Il permet la surexpression des récepteurs  $\text{GABA}_A$ . *UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>* permet de diminuer par interférence ARN l'expression ("knock-down") du récepteur dopaminer-

## Chapitre 5. Électrophysiologie optique alliant imagerie HiLo haute cadence et biosenseurs fluorescents ultra-rapides

gique DAMB, de type activateur D1 [203]. La séquence UAS (Upstream Activation Sequence) est une séquence régulatrice, activée par la protéine GAL4, permettant l'expression du gène connexe codant par exemple pour l'un des effecteurs sur les récepteurs dopaminergiques *UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>* ou GABAergiques *UAS-RDL<sup>HA</sup>*, ou pour l'un des rapporteurs fluorescents de l'activité neuronale : la sonde calcique G-CaMP6f ou la sonde voltage ArcLight.

### 5.1.3.2 Standardisation de l'expérience

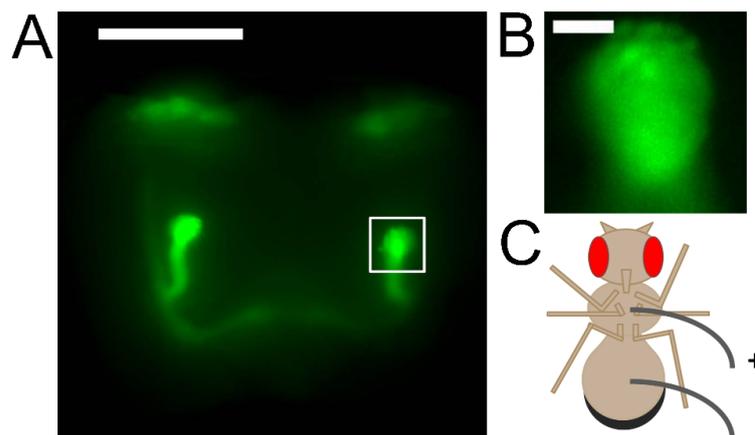


FIGURE 5.6 – (A) Projection d'intensité maximale de l'image des corps pédonculés sur  $100\ \mu\text{m}$  de profondeur. Le carré blanc entoure l'un des deux lobes  $\alpha$  qui est agrandi en (B). Barre d'échelle :  $100\ \mu\text{m}$ . (B) Lobe  $\alpha$  marqué avec la sonde voltage ArcLight. Barre d'échelle :  $10\ \mu\text{m}$ . (C) Illustration de la configuration de stimulation électrique de la mouche montrant le positionnement des électrodes.

Les mouches utilisées pour les études présentées dans ce chapitre ont été élevées à  $25^\circ\text{C}$  et sont âgées, lors de l'imagerie, de trois à cinq jours. Elles sont préparées à l'imagerie comme présenté dans la section 1.4 du Chapitre 1. Aucune anesthésie n'est utilisée pour limiter l'impact sur l'imagerie fonctionnelle. La zone imagée est le faisceau d'axones formant le lobe  $\alpha$  (voir les figures 5.6A et B). Environ 1000 axones de neurones, de diamètre typique  $200\ \text{nm}$ , espacés les uns des autres d'environ  $100\ \text{nm}$ , y sont regroupés en faisceau et la direction d'observation est choisie le long de ces axones de sorte qu'ils soient observés en coupe transverse dans l'image. Les images ont une taille de 128 par 128 pixels ce qui correspond à une zone de  $33\ \mu\text{m}$  par  $33\ \mu\text{m}$  dans l'échantillon, comme illustrée sur la figure 5.6B. La résolution spatiale latérale est d'environ  $400\ \text{nm}$  et ne permet donc pas de résoudre parfaitement les axones de manière individuelle. L'imagerie est réalisée *in vivo* sur le cerveau de la drosophile adulte et le suivi de l'activité neuronale est médié par l'étude des variations de fluorescence d'un biosenseur fluorescent de type calcique G-CaMP6f ou voltage ArcLight.

L'activité neuronale n'est malheureusement pas la seule source de variation du signal de fluorescence des sondes. L'intensité de fluorescence mesurée peut également être affectée par les mouvements de l'échantillon biologique vivant complexifiant l'analyse des données, voire même rendant toute observation quantitative d'activité neuronale impossible. Ainsi, un gel

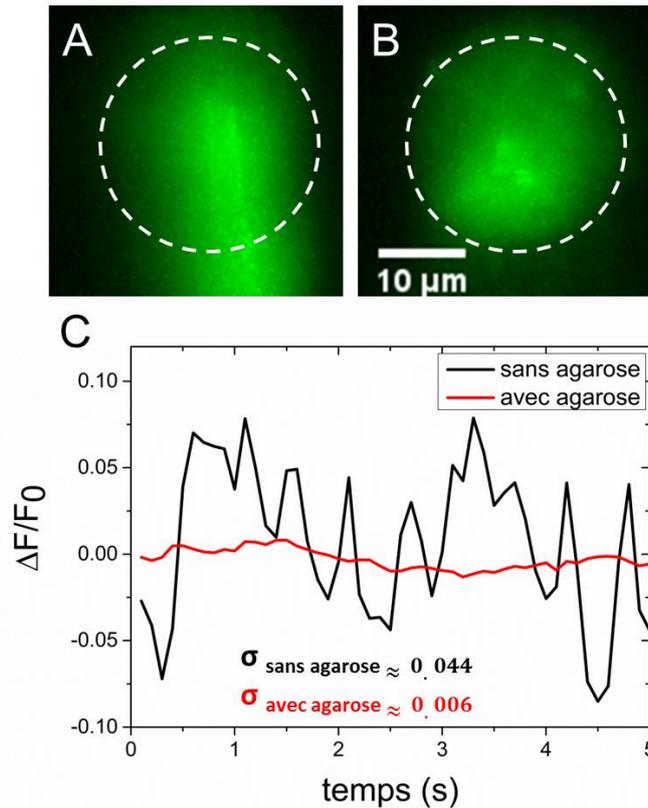


FIGURE 5.7 – (A) Projection d’intensité maximale de 100 images de lobe  $\alpha$  sans utiliser d’agarose. (B) Projection d’intensité maximale de 100 images de lobe  $\alpha$  de la même drosophile que celle présentée en (A) avec ajout d’un gel d’agarose de concentration massique 2%. Pour (A) et (B), le cercle en pointillé correspond au lobe  $\alpha$  en l’absence de mouvement. (C) Variation relative de l’intensité de fluorescence au niveau du lobe  $\alpha$  sans (en noir) et avec l’agarose (en rouge) en l’absence de stimulation.

d’agarose est utilisé pour limiter les mouvements du cerveau de la drosophile. Les figures 5.7A et B représentent des images de projection maximale d’intensité d’un même plan dans l’échantillon pendant une durée d’imagerie de 5 secondes à une fréquence d’acquisition de 10 Hz. Cette représentation permet de déterminer l’étendue latérale du mouvement de l’échantillon au cours du temps. L’étendue spatiale du mouvement est largement réduite lorsque l’on utilise un gel d’agarose (figure 5.7B). L’ajout d’agarose permet alors une réduction de l’amplitude des variations relatives de fluorescence  $\Delta F/F_0$  qui ne sont dues qu’à des mouvements parasites et non à une activité cérébrale (figures 5.7C) : on passe d’une déviation standard de la variation de fluorescence de 4.4 % à environ 0.6 % grâce à l’agarose. La grandeur  $\Delta F/F_0$ , conventionnellement utilisée pour quantifier l’imagerie fonctionnelle, a été définie dans la section 4.4.2 du Chapitre 4.

### 5.1.3.3 Effet de la molécule de thapsigargine sur les réserves calciques

Afin d’étudier le rôle des réserves de calcium intracellulaire dans la signalisation de réponse, nous avons utilisé la thapsigargine. Les résultats seront présentés dans la section 5.2.2. La

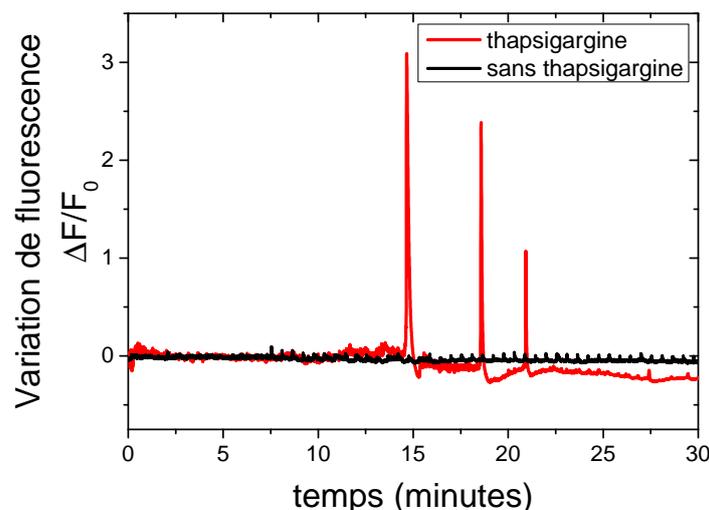


FIGURE 5.8 – Intensité de fluorescence de la sonde calcique G-CaMP6f intégrée sur l'ensemble du lobe  $\alpha$  au cours des 30 minutes d'application de la solution contrôle (représentée en noir) ou de la solution contenant la thapsigargine (représentée en rouge). La solution contrôle est une solution de liquide physiologique sans  $\text{CaCl}_2$  additionné de DMSO à la même concentration que dans la solution contenant la thapsigargine.

thapsigargine est un inhibiteur puissant de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase et a pour effet d'augmenter la concentration de calcium cytosolique en empêchant la cellule de le pomper pour le stocker dans les réservoirs des réticula sarco- et endoplasmique. La thapsigargine (Tocris Biosciences) a été préparée dans du DMSO (Diméthyl sulfoxyde) à une concentration stock de 5 mM, puis dissoute dans du liquide physiologique Ringer privé de  $\text{CaCl}_2$  à une concentration finale de 25  $\mu\text{M}$ . 200  $\mu\text{L}$  de cette solution finale de concentration égale à 25  $\mu\text{M}$  en thapsigargine ont été appliqués directement sur le cerveau des drosophiles sous le microscope pendant 30 minutes, tout en suivant la fluorescence avec une cadence d'imagerie de 0.1 Hz afin de s'assurer que la molécule de thapsigargine a correctement agi. Le volume d'agarose déposé sur le cerveau de la drosophile entraîne des variations sur la vitesse d'action de la thapsigargine, c'est pourquoi la fluorescence a été suivie sur une relativement grande plage temporelle, typiquement 30 minutes. L'action de la thapsigargine a été testée sur la lignée *C739-GAL4,UAS-G-CaMP6f/+*. Elle se traduit par la présence de pics de fluorescence, comme montré sur la figure 5.8, reflétant le relargage synchrone par les neurones du lobe  $\alpha$  des réserves de calcium intracellulaire dans le cytosol, avant d'être repompées par les pompes de la membrane plasmique dans le milieu extracellulaire. Les cerveaux ont ensuite été rincés pendant 30 minutes avec la solution physiologique Ringer traditionnelle, c'est-à-dire non privée de  $\text{CaCl}_2$ , dont la composition précise est donnée dans la section 1.4 du Chapitre 1.

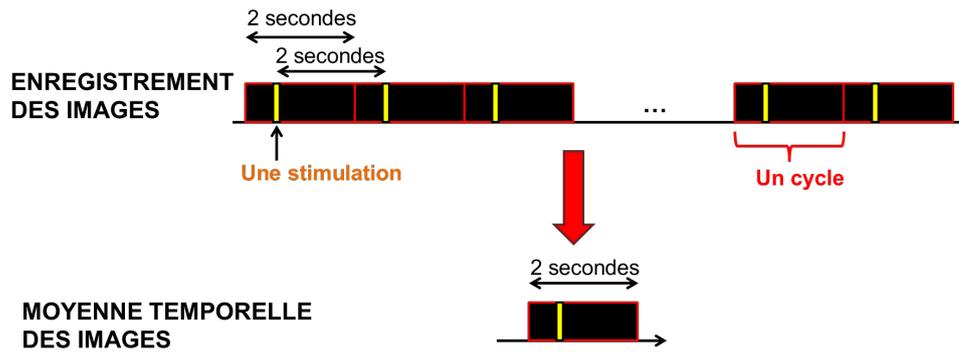


FIGURE 5.9 – Protocole d’enregistrement des images et application de la stimulation électrique. La première ligne correspond à l’enregistrement des images. Chaque rectangle noir encadré de rouge correspond à un cycle d’imagerie comprenant 200 images prises avec une cadence d’imagerie de 100 Hz, soit 2 secondes d’imagerie. La stimulation électrique est représentée par le rectangle jaune dans le cycle d’imagerie. Elle est délivrée à l’image numéro 50 d’un cycle en comptant 200. Elle est répétée avec une fréquence de 0.5 Hz. Après traitement des données (deuxième ligne de la figure), il ne subsiste que l’information temporelle sur une période de deux secondes avec un signal de réponse moyenné.

## 5.1.4 Traitement informatique des données

### 5.1.4.1 Protocole de traitement pour le moyennage de signaux

Les stimulations utilisées étant extrêmement brèves, de l’ordre de la dizaine de millisecondes, la stimulation a été répétée de manière périodique puis les signaux de réponse ont été moyennés afin d’augmenter le rapport signal sur bruit des réponses observées. Une schématisation du protocole de moyennage des signaux est représentée sur la figure 5.9. La fraction de réponse sera quantifiée grâce à la formule  $\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F - F_0}{F_0}$  où  $F_0$  est la fluorescence à l’état basal c’est-à-dire avant la stimulation.

### 5.1.4.2 Réalignement spatial latéral des piles d’images

Malgré la mise en place d’un gel d’agarose pour réduire la composante principale du mouvement, il subsiste des mouvements résiduels d’une fraction de micron d’amplitude latérale. Il est possible de recalibrer les images *a posteriori* à l’aide d’une extension de ImageJ. Ce traitement supplémentaire a été mis en œuvre pour les données ayant servi à créer des cartographies spatiales des zones excitées et des zones inhibées au sein de la branche verticale du faisceau d’axones de neurones  $\alpha/\beta$ . Ce traitement n’a pas été effectué sur les images brutes plein champ puisque celles-ci sont ‘floues’ car contenant l’information basse fréquence spatiale des plans qui ne sont pas au point. Le recalage des images a été mis en œuvre sur les images HiLo reconstruites. Cette approche est cohérente car les deux images enregistrées soit avec une illumination uniforme, soit avec une illumination structurée, qui ont servi à reconstruire l’image HiLo, sont séparées d’un intervalle de temps de 10 millisecondes, suffisamment court pour que les mouvements de la drosophile soient limités. Il est nécessaire de réaligner précisément les

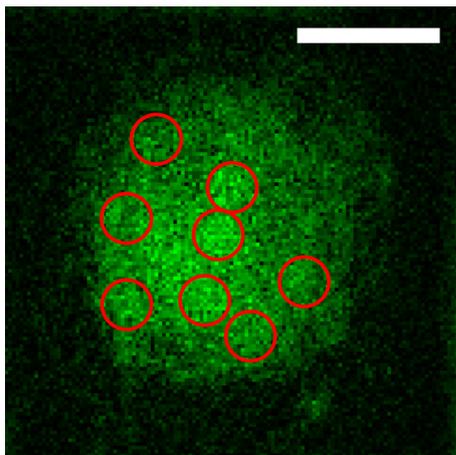


FIGURE 5.10 – Points d’ancrage utilisés pour le recalage des 5000 images HiLo du lobe  $\alpha$ . La barre d’échelle correspond à  $10 \mu\text{m}$ .

images pour cette application particulière de cartographie spatiale, car l’information que l’on cherche à extraire n’est pas seulement une variation moyenne de l’intensité de fluorescence dans l’image mais des comportements locaux à l’échelle du micron. L’extension de ImageJ utilisée est “Descriptor-based series registration (2d/3d+t)” [192] qui est la même que celle utilisée dans la section 4.5.1 du Chapitre 4 pour le recalage des images des noyaux des neurones des corps pédonculés marqués avec la protéine mCherry-NLS. La transformation choisie est la translation à deux dimensions avec comparaison de chacune des 5000 images à ses 100 voisines (All-to-all matching with range : “reasonable” global optimization). Dans l’exemple présenté ici, huit points d’ancrage pour le recalage des images sont choisis automatiquement, comme représenté sur la figure 5.10. Le nombre et la taille des points d’ancrage sont des paramètres ajustables contrairement à leur positionnement dans l’image qui se fait de manière automatique.

### 5.1.4.3 Création de cartographies HiLo de réponse aux chocs électriques en utilisant la sonde voltage ArcLight

Afin d’exploiter au maximum l’avantage de l’optique par rapport à l’électrophysiologie classique, qui est limitée au suivi de l’activité de quelques neurones, des études spatialement étendues de l’activité neuronale ont été effectuées grâce à la technique de microscopie plein champ HiLo. En effet, l’optique permet le suivi de nombreux neurones et cela en parallèle si la technique de microscopie est adaptée. Pour étudier l’activité neuronale *in vivo* sur un grand nombre de neurones simultanément, je me suis intéressée plus particulièrement aux populations de neurones qui sont activées ou sont inhibées au niveau d’une section du faisceau d’axones du lobe  $\alpha$ . La limite de résolution théorique du microscope est d’environ 400 nm latéralement (pour un objectif d’ouverture numérique égale à 0.95) et le diamètre typique des axones des corps pédonculés est de 200 nm chez la drosophile. Ainsi, les différents axones ne seront pas résolus un à un comme cela est réalisable en microscopie électronique [204]. L’imagerie sera alors réalisée avec une précision de quelques neurones. Ce qui nous intéresse dans notre étude est de déterminer des sous-populations de neurones, la résolution à l’échelle du neurone individuel n’y est pas indispensable. Des cartographies d’activité neuronale ont

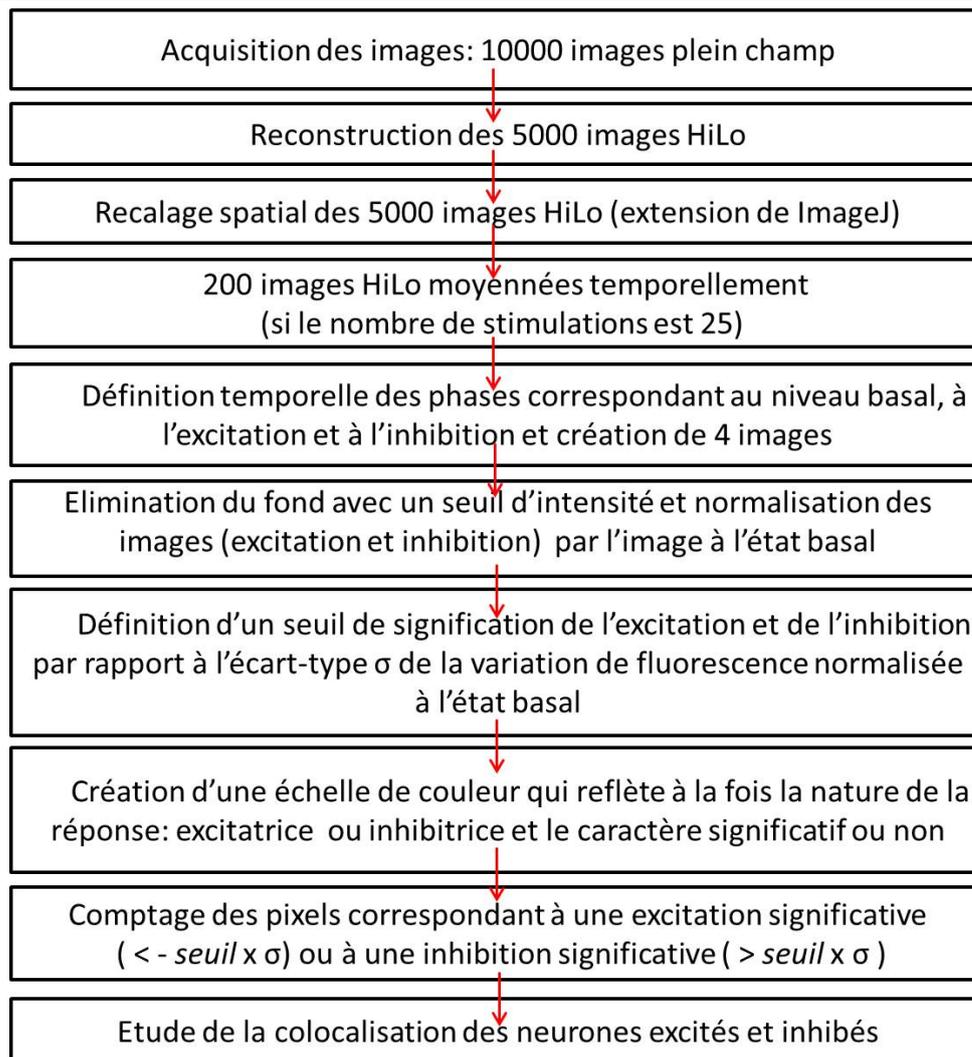


FIGURE 5.11 – Protocole de traitement des images depuis l’acquisition au microscope jusqu’à la détermination de paramètres biologiques d’intérêt tel que le pourcentage de neurones du lobe  $\alpha$  excités ou inhibés au cours d’une stimulation.

alors été effectuées en suivant les différentes étapes résumées sur la figure 5.11. Une fois les images HiLo reconstruites comme expliqué en détail au Chapitre 2, puis réalignées, la première étape consiste à moyenner temporellement, mais non spatialement, les images correspondant aux différents cycles de stimulation. La deuxième étape du traitement consiste à définir, à partir du profil temporel d’intensité de fluorescence des images HiLo moyennées, différents intervalles temporels comme représenté sur la figure 5.12 :

- a-b : avant la stimulation,
- b-c et c-d : durant le pic excitateur défini tel que  $\Delta F/F_0 < 0$ ,
- d-e : pendant l’inhibition définie telle que  $\Delta F/F_0 > 0$ .

A partir de ces intervalles temporels, quatre images correspondant aux différentes étapes de la réponse physiologique sont alors créées. Les images entre a et b, entre b et c ainsi que c et d, et enfin entre d et e serviront à créer respectivement l’image de fluorescence basale, les images

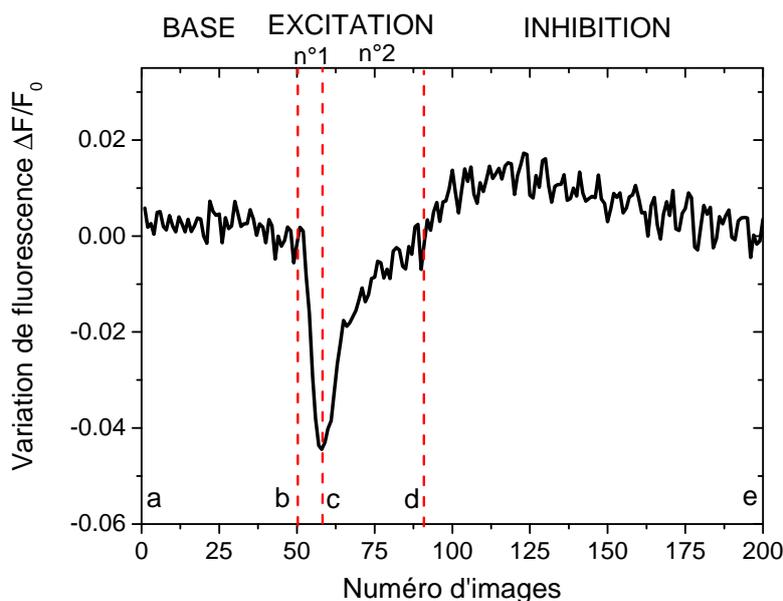


FIGURE 5.12 – Variation relative de l’intensité de fluorescence  $\Delta F/F_0$  de la sonde voltage ArcLight pour une stimulation moyennée 25 fois et définition des zones correspondant aux différentes phases physiologiques de la réponse : a-b : état basal, b-c : première partie de l’excitation, c-d : deuxième partie de l’excitation, d-e : inhibition. L’intensité de fluorescence est intégrée sur toute l’image.

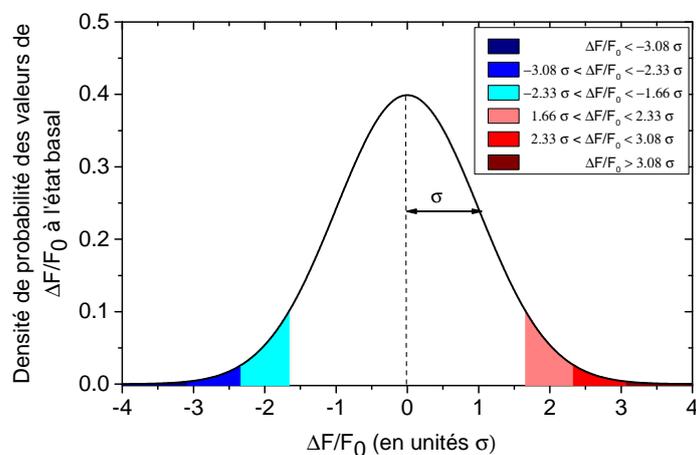


FIGURE 5.13 – Densité de probabilité des valeurs de  $\Delta F/F_0$ .  $\sigma$  est l’écart-type de la distribution à l’état basal, c’est-à-dire en l’absence de toute stimulation. Dans cette représentation, la moyenne  $\langle x \rangle$  est nulle. Les différentes teintes de bleu et de rouge correspondent respectivement à différents niveaux d’excitation et d’inhibition significatifs.

pendant la phase excitatrice de la réponse et l’image correspondant à la phase inhibitrice de la réponse. La troisième étape consiste à supprimer le “fond” qui ne correspond pas à la zone biologique d’intérêt en définissant un seuil d’intensité de signal de fluorescence par rapport

à l'intensité moyenne du bruit de fond. Les images correspondant aux phases excitatrice et inhibitrice de la réponse sont ensuite normalisées par rapport à l'image de fluorescence à l'état basal. Les images créées reflètent alors des variations de fluorescence  $\Delta F/F_0$  et non plus simplement des niveaux d'intensité de fluorescence, ce qui permet de s'affranchir d'une variation éventuelle d'expression de la sonde spatialement, même en l'absence de stimulation ou d'une intensité du faisceau lumineux d'excitation non uniforme spatialement.

Afin de quantifier un effet biologique, on se propose tout d'abord de déterminer, dans les images, les pixels correspondant soit à des valeurs positives significatives (processus d'inhibition) soit à des valeurs négatives significatives (processus d'excitation). Comme décrit dans la section 1.3.2.2 du Chapitre 1, l'intensité de fluorescence de la sonde voltage ArcLight décroît lors de l'excitation du neurone et augmente dans le cas d'une inhibition. Les seuils de signification sont définis en considérant une distribution selon une loi normale des valeurs de  $\Delta F/F_0$ . La loi normale est très couramment utilisée en statistique. Mathématiquement, elle s'exprime sous la forme d'une fonction gaussienne  $G$ , telle que :

$$G(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x - \langle x \rangle)^2}{2\sigma^2}\right), \text{ avec } \int_{-\infty}^{+\infty} G(x)dx = 1, \quad (5.1)$$

où  $x$  correspond à  $\Delta F/F_0$  et  $\langle x \rangle$  est la valeur moyenne de  $x$ .  $\sigma$  est l'écart-type de la variation de fluorescence  $\Delta F/F_0$  sur un intervalle temporel correspondant à une phase sans stimulation. La distribution statistique est représentée sur la figure 5.13. Les intervalles de probabilité tracés correspondent à :

$$\begin{aligned} \int_{-\infty}^{-1.66\sigma} G(x)dx &= \int_{1.66\sigma}^{+\infty} G(x)dx = 0.05, \\ \int_{-\infty}^{-2.33\sigma} G(x)dx &= \int_{2.33\sigma}^{+\infty} G(x)dx = 0.01, \\ \int_{-\infty}^{-3.08\sigma} G(x)dx &= \int_{3.08\sigma}^{+\infty} G(x)dx = 0.001. \end{aligned} \quad (5.2)$$

Les valeurs 0.05, 0.01 et 0.001 correspondent à des valeurs de probabilités  $p$  reflétant différents seuils de signification pour les tests statistiques (qui seront décrits dans la section 5.1.4.4). Les correspondances entre valeurs de  $\Delta F/F_0$  et probabilité statistique  $p$  sont résumées dans le tableau 5.1.

Pour présenter ces résultats de manière lisible sur une image, comme montré à la figure 5.32, une échelle de couleur a été spécialement développée. Les pixels correspondant à des valeurs de variation de fluorescence non significative sont représentés en blanc. Les pixels correspondant à des valeurs de variation de fluorescence significativement positives sont représentés en rouge avec une échelle de teinte. De même, une échelle de bleu est utilisée pour représenter les valeurs significativement négatives. L'avant-dernière étape consiste à évaluer le pourcentage de neurones excités ou inhibés. Ce dernier est défini comme le nombre de pixels pour lesquels la variation de fluorescence est significativement négative ou positive respectivement, suivant le seuil de signification défini précédemment, divisé par le nombre total de pixels comptabilisés dans le lobe  $\alpha$ . Enfin, une cartographie du lobe  $\alpha$  récapitulative a été créée faisant apparaître en rouge les pixels inhibés et bleu les pixels excités et en vert les pixels à la fois excités et

## Chapitre 5. Électrophysiologie optique alliant imagerie HiLo haute cadence et biosenseurs fluorescents ultra-rapides

$x = \Delta F/F_0$	$p$	Biologie
$x < -3.08 \sigma$	$<0.001$	excitation significative (***)
$-3.08 \sigma < x < -2.33 \sigma$	$<0.01$	excitation significative (**)
$-2.33 \sigma < x < -1.66 \sigma$	$<0.05$	excitation significative (*)
$-1.66 \sigma < x < 1.66 \sigma$	$> 0.05$	non significatif
$1.66 \sigma < x < 2.33 \sigma$	$<0.05$	inhibition significative (*)
$2.33 \sigma < x < 3.08 \sigma$	$<0.01$	inhibition significative (**)
$x > 3.08 \sigma$	$<0.001$	inhibition significative (***)

Tableau 5.1 – Tableau récapitulatif des seuils de probabilité  $p$  en fonction de l'écart-type  $\sigma$  de la distribution des valeurs de  $\Delta F/F_0$  à l'état basal et signification biologique.

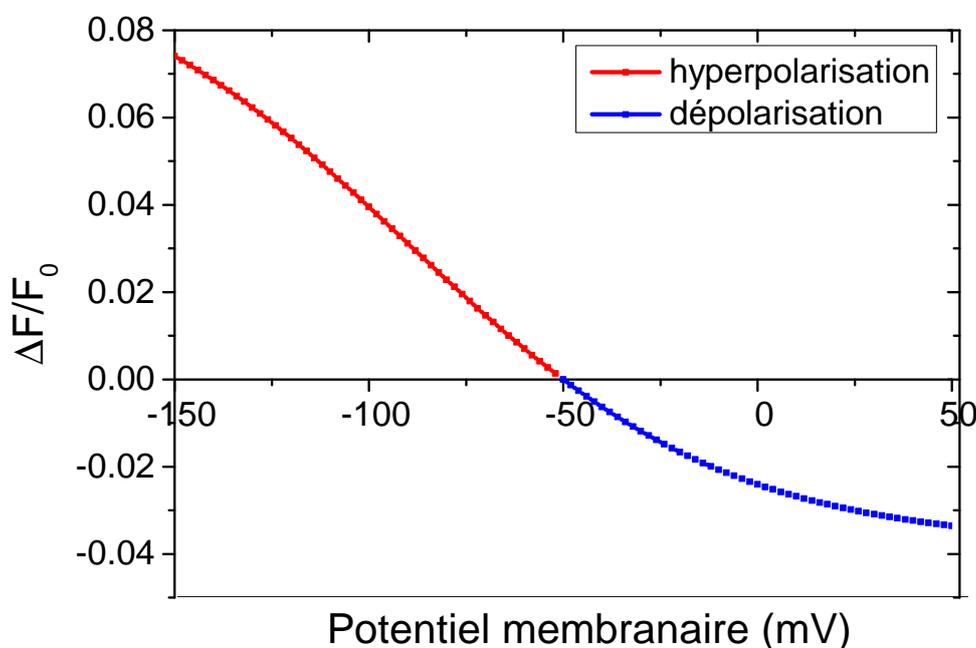


FIGURE 5.14 – Courbe de calibration de la variation de fluorescence de la sonde voltage ArcLight en fonction du potentiel membranaire. Cette courbe a été déterminée pour des neurones ILNvs chez la drosophile [10].

inhibés en réponse à la stimulation.

La sonde fluorescente encodée génétiquement ArcLight permet de suivre l'activité électrique des neurones. Ainsi, toutes les variations de fluorescence  $\Delta F/F_0$  peuvent être converties en termes de différence de potentiel transmembranaire. Les développeurs de la sonde voltage ArcLight [10] ont calibré la valeur du potentiel membranaire en fonction de la variation de fluorescence  $\Delta F/F_0$  chez la drosophile, au niveau des neurones ILNvs (“Large ventral lateral

clock neurons”) impliqués dans le rythme circadien. La courbe de calibration a une forme sigmoïdale. Elle est représentée sur la figure 5.14, et sa formulation est explicitée dans l’équation suivante :

$$\frac{\Delta F}{F_0} = A_1 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \exp\left(\frac{V - V_0}{S}\right)}, \quad (5.3)$$

où  $V$  correspond au potentiel membranaire,  $A_1 = 10.0$ ,  $A_1 - A_2 = -13.8$ ,  $V_0 = -49.8$  et  $S = 41.1$ .

#### 5.1.4.4 Analyse statistique

Les comparaisons statistiques présentées dans les sections 5.2 et 5.3 ont été réalisées avec le logiciel Origin 9.1. Le caractère statistiquement significatif de la différence entre plusieurs groupes a été testée à l’aide d’une analyse de variance (ANOVA) suivie d’une correction de Bonferroni. Les étoiles sur les graphiques quantifient le seuil de significativité. Ce seuil, noté  $p$ , correspond à la probabilité que les deux échantillons observés soient issus d’un tirage d’une même population. Une étoile \*, deux étoiles \*\* et trois étoiles \*\*\* dénotent respectivement une probabilité  $p$  inférieure à 0.05, 0.01 et 0.001.

## 5.2 Résultats : Comparaison des sondes fluorescentes calcique G-CaMP6f et voltage ArcLight

### 5.2.1 Caractéristiques physiques

#### 5.2.1.1 Brillance

Afin de comparer en premier abord les deux sondes fluorescentes G-CaMP6f et ArcLight, j’ai évalué la “brillance” des deux sondes à l’état basal. La brillance est ici définie comme étant l’intensité de fluorescence moyenne du lobe  $\alpha$  en l’absence de stimulation. A l’état basal, la sonde voltage ArcLight est environ 3.5 fois plus brillante que la sonde calcique (figure 5.15C). A titre de contrôle, j’ai également comparé la brillance de la sonde ArcLight (respectivement G-CaMP6f) dans différents contextes génétiques, en particulier ceux correspondant à un “knock-down” de plusieurs récepteurs de neurotransmetteur et je n’ai pas observé de variations significatives (figure 5.15A et B). La sonde voltage ArcLight présente donc l’avantage d’être plus brillante que la sonde calcique G-CaMP6f, à l’état basal, dans les mêmes conditions d’imagerie. Néanmoins, il faut garder à l’esprit que la sonde voltage, lorsqu’elle va être excitée, ne va présenter, par neurone, qu’une variation de fluorescence  $\Delta F/F_0$  de -100% alors que cette variation peut atteindre +300% pour la sonde calcique utilisée.

#### 5.2.1.2 Temps caractéristiques de réponse

Pour comparer les temps de réponse des sondes G-CaMP6f et ArcLight, j’ai mesuré les variations de fluorescence de ces deux sondes lorsque la mouche est soumise à une stimulation

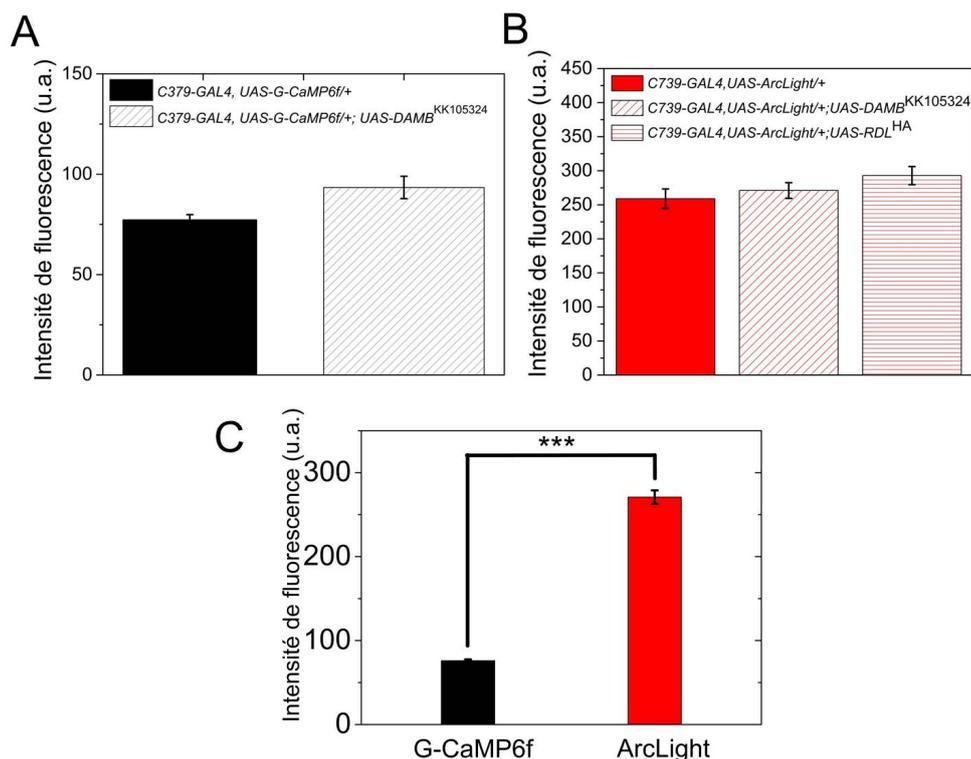


FIGURE 5.15 – (A) Comparaison de l’intensité de fluorescence basale au niveau du lobe  $\alpha$  pour des mouches *C739-GAL4, UAS-G-CaMP6f/+* ( $n = 73$ ) et des mouches *C739-GAL4, UAS-G-CaMP6f/+; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>* ( $n = 8$ ). (B) Comparaison de l’intensité de fluorescence basale au niveau du lobe  $\alpha$  pour des mouches *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+* ( $n = 33$ ) et des mouches mutantes *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>* ( $n = 26$ ) et *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-RDL<sup>HA</sup>* ( $n = 18$ ). (C) Comparaison de l’intensité de fluorescence basale au niveau du lobe  $\alpha$  pour des mouches exprimant soit la sonde calcique G-CaMP6f ( $n = 81$ , représenté en noir) soit la sonde voltage ArcLight ( $n = 77$ , représenté en rouge).  $p < 0.001$ , après correction de Bonferroni. La moyenne et l’erreur standard de la moyenne (SEM) sont représentées.  $n$  correspond au nombre de mouches testées.

brève et de faible amplitude. Les mouches ont été stimulées avec quatre cycles de cinquante micro-chocs de 20 ms et d’amplitude 20  $\mu$ A. Sur la figure 5.16A, sont représentées à titre d’exemple dix de ces stimulations non moyennées. Les réponses des différentes stimulations ont été moyennées afin d’augmenter le rapport signal sur bruit. Les temps de réponse à l’excitation et de retour au niveau de base, obtenus par modélisation exponentielle [65], pour les sondes calcique G-CaMP6f et voltage ArcLight sont donnés dans le tableau 5.2. La sonde calcique G-CaMP6f présente une grande asymétrie de réponse entre le temps de réponse à l’excitation et le temps de retour au niveau de base, avec un temps de retour à l’état basal relativement long. La sonde voltage est donc significativement plus rapide que la sonde calcique G-CaMP6f pour suivre à la fois les processus de réponse à l’excitation et de retour à l’état basal (figure 5.16D).

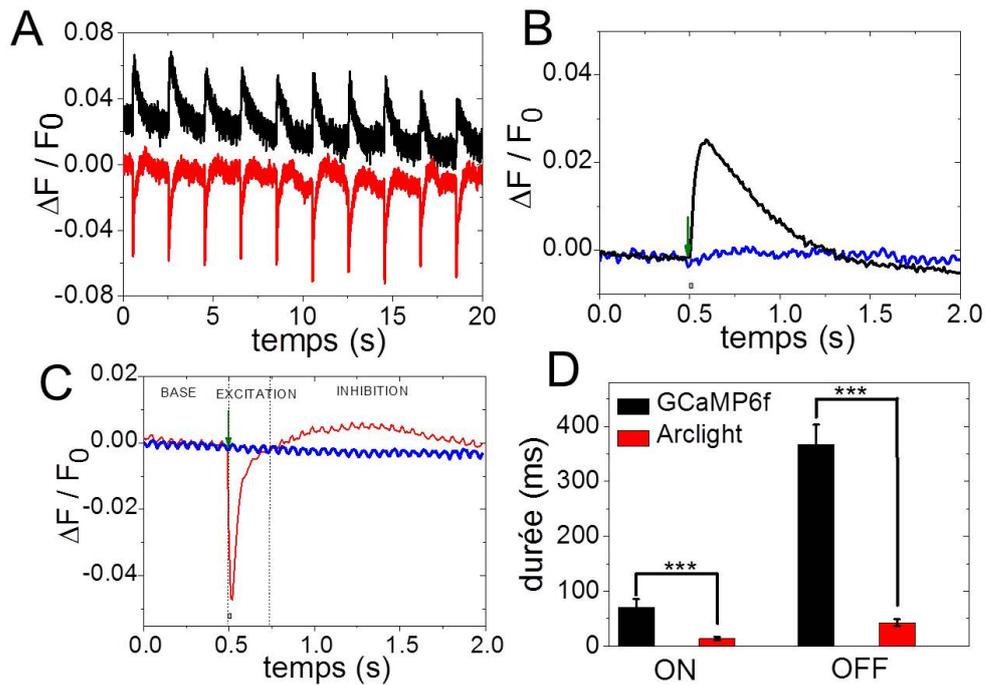


FIGURE 5.16 – Comparaison des réponses à des faibles stimulations avec les sondes calcique G-CaMP6f et voltage ArcLight. (A) Réponses brutes à des faibles stimulations (20 ms, 20  $\mu$ A) pour les deux biosenseurs fluorescents G-CaMP6f (en noir) et ArcLight (en rouge). (B) La moyenne de 200 réponses à des micro-chocs électriques observées avec la sonde calcique G-CaMP6f est représentée en noir. (C) La moyenne de 200 réponses à des micro-chocs électriques observées avec la sonde voltage ArcLight est représentée en rouge. Nous n'avons pas d'explication pour les oscillations rapides résiduelles. Pour (B) et (C), la courbe bleue correspond à l'évolution de la fluorescence en l'absence de stimulation. La flèche verte indique le moment où la stimulation est délivrée et le rectangle gris la période temporelle pendant laquelle est délivré le choc. (D) Temps caractéristiques de réponse en excitation (ON) et de retour au niveau de base (OFF) pour les sondes calcique G-CaMP6f (en noir) et voltage ArcLight (en rouge). Ces temps ont été déterminés par modélisation exponentielle des courbes de réponse moyennées. ( $n = 11$  pour chacun des deux génotypes,  $p < 0.001$ , après correction Bonferroni). La moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) sont représentées.

	Temps de réponse à l'excitation "ON"	Temps de retour au niveau de base "OFF"
G-CaMP6f	70 ± 11 ms	370 ± 40 ms
ArcLight	13 ± 3 ms	42 ± 6 ms

Tableau 5.2 – Tableau récapitulatif des temps de réponse à l'excitation "ON" et retour à l'état basal "OFF" pour les rapporteurs fluorescents d'activité neuronale G-CaMP6f et ArcLight.

On peut noter par ailleurs que la sonde voltage ArcLight présente des variations de fluorescence non seulement positives mais également négatives (figure 5.16C). Cette caractéristique permet d'observer à la fois une phase de dépolarisation (excitation) puis d'hyperpolarisation (inhibition) neuronale, qu'il n'est pas possible d'observer avec la sonde calcique.

### 5.2.2 Étude de processus physiologiques : Sensibilisation voltage et désensibilisation calcique

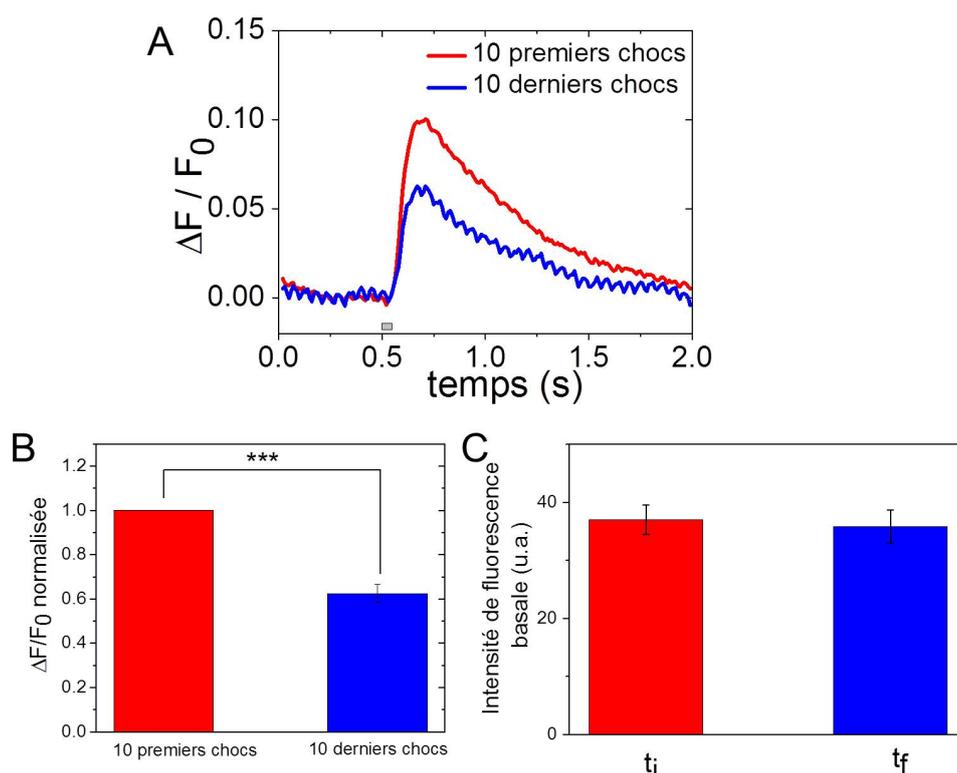


FIGURE 5.17 – Réponses de la sonde calcique G-CaMP6f à de fortes stimulations répétées : 4 cycles de 50 chocs de 50 ms et 80  $\mu$ A. (A) Réponses moyennées exprimées en variation de fluorescence  $\Delta F / F_0$  pour les dix premiers chocs du premier cycle et les dix derniers chocs du dernier cycle. Le rectangle gris indique la période temporelle pendant laquelle est délivré le choc. (B) Comparaison de la variation de fluorescence entre les dix premiers chocs du premier cycle et les dix derniers chocs du dernier cycle. La valeur de  $\Delta F / F_0$  a été normalisée par rapport à sa valeur pour les dix premiers chocs ( $n = 36$ ,  $p < 0.001$  post correction Bonferroni). (C) Comparaison de l'intensité de fluorescence basale de la sonde G-CaMP6f entre le moment  $t_i$  qui correspond aux dix premiers chocs du premier cycle et  $t_f$  qui correspond aux dix derniers chocs du derniers cycle. ( $n = 36$ , non significatif, post correction Bonferroni). Pour (B), (C), la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) sont représentées.

Dans le domaine de la neurobiologie de la drosophile, il est couramment admis que les sondes calciques encodées génétiquement sont des rapporteurs fidèles de l'activité neuronale.

Une corrélation existe en effet entre le nombre de potentiels d'action générés par un neurone et son niveau de calcium intracytoplasmique. Cette corrélation a une base physiologique identifiée car le passage des potentiels d'action conduit à l'ouverture de canaux ioniques dont certains sont perméables aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . En particulier, au niveau des synapses, l'ouverture des canaux calciques joue un rôle fondamental dans l'exocytose des vésicules synaptiques, permettant ainsi la neurotransmission chimique [205]. Néanmoins, nous avons cherché à déterminer s'il est parfaitement correct de relier l'activité neuronale à la simple concentration en calcium intracytoplasmique dans les neurones des corps pédonculés que nous étudions, car bien que cela soit souvent négligé, l'entrée extracellulaire de calcium liée au potentiel d'action n'est pas la seule source du calcium intracytoplasmique.

Pour tester cela, j'ai comparé la réponse de la sonde voltage qui, par principe, est sensible au potentiel membranaire, et suit donc fidèlement l'activité neuronale et celle de la sonde calcique pour différentes stimulations. Plus précisément, j'ai suivi l'évolution de la réponse aux chocs électriques à l'aide des sondes calcique G-CaMP6f et voltage ArcLight au niveau du lobe  $\alpha$  des corps pédonculés en délivrant quatre séries de stimulations intenses (50 ms et 80  $\mu\text{A}$ ). La figure 5.17A montre un exemple de diminution de la variation de fluorescence de la sonde calcique G-CaMP6f entre les dix premiers chocs de la première série et les dix derniers chocs de la dernière série. Pour quantifier cet effet, l'évolution de la variation de fluorescence a été moyennée pour 36 drosophiles. Sur la figure 5.17B, la variation de fluorescence  $\Delta F/F_0$  a été normalisée par rapport à la première série de chocs. En effet, bien que les électrodes soient positionnées toujours de la même façon et que l'intensité électrique de la stimulation soit la même pour chacune des drosophiles, il subsiste entre individus une variabilité d'intensité de la réponse. En considérant les dix premiers chocs de la première série et les dix derniers chocs de la quatrième et dernière série de stimulation, on observe une diminution significative de 40% de la variation de fluorescence (figure 5.18B). Afin d'éliminer la possibilité que cet effet ne soit qu'un artefact de photoblanchiment de la sonde fluorescente, le niveau de fluorescence basal a été étudié au cours du temps. Le résultat est donné sur la figure 5.17C. Temporellement,  $t_i$  et  $t_f$  correspondent respectivement au début de la première acquisition et à la fin de la dernière acquisition. La drosophile a été typiquement exposée au laser durant quatre cycles d'imagerie de durée 100 secondes chacun. Ce qui est représenté sur la figure 5.17C ne correspond pas à des variations de fluorescence mais à l'intensité de fluorescence moyenne par pixel de la zone observée sans stimulation. Aucun photoblanchiment significatif n'a été mis en évidence. Pour les quantifications comme celle présentée sur la figure 5.17B, il faut toutefois noter que le photoblanchiment est en grande partie corrigé car ce qui est défini comme réponse à la stimulation est la variation de fluorescence normalisée  $\Delta F/F_0$ , où  $F_0$  est le niveau d'intensité de fluorescence basal. L'information d'un possible photoblanchiment est alors contenue dans le terme  $F_0$ . Un artefact de photoblanchiment ne peut donc pas influencer directement sur nos observations, à savoir une diminution de la réponse au cours des séries de stimulations. La normalisation permet de rendre plus robuste les études quantitatives réalisées avec des techniques de microscopie de fluorescence. Seul un effet du second ordre dû au photoblanchiment différentiel de la sonde fluorescente calcique G-CaMP6f dans le plan de focalisation observé et du fond, pourrait en partie expliquer notre résultat, notamment si le plan imagé subit un photoblanchiment plus intense que les plans hors mise au point.

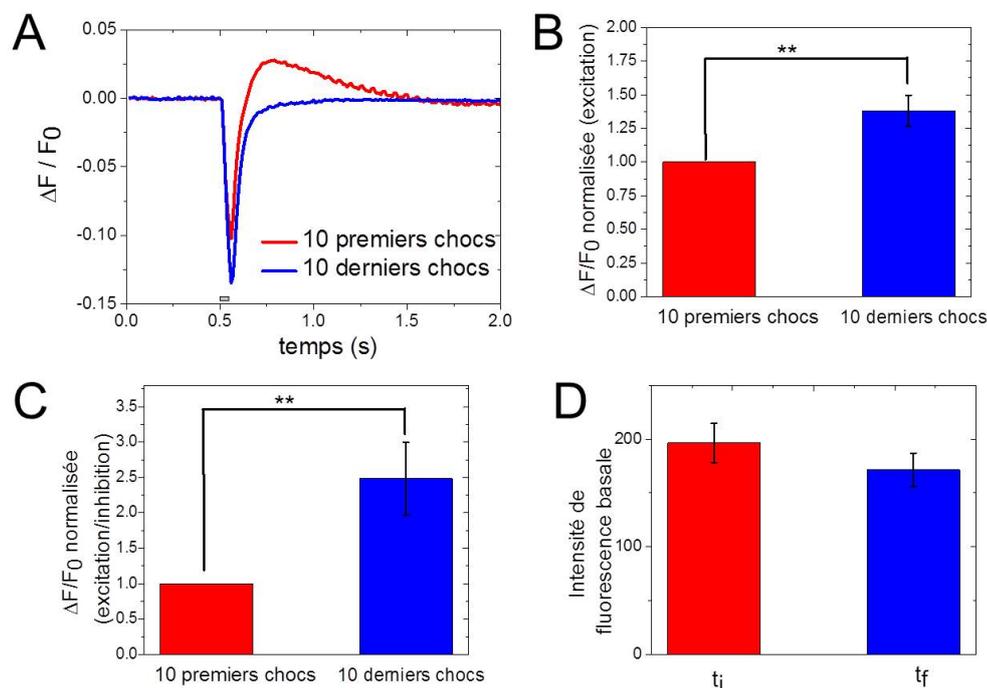


FIGURE 5.18 – Réponses de la sonde voltage ArcLight à de fortes stimulations répétées : 4 cycles de 50 chocs de 50 ms et  $80 \mu\text{A}$ . (A) Réponses moyennées exprimées en variation de fluorescence  $\Delta F/F_0$  pour les dix premiers chocs du premier cycle et les dix derniers chocs du dernier cycle. Le rectangle gris indique la période temporelle pendant laquelle est délivré le choc. (B) Comparaison de l'évolution de la variation de fluorescence, en tenant compte uniquement de l'excitation, entre les dix premiers chocs du premier cycle et les dix derniers chocs du dernier cycle. La valeur de  $\Delta F/F_0$  a été normalisée par rapport à sa valeur pour les dix premiers chocs ( $n = 16$ ,  $p < 0.01$  post correction Bonferroni). (C) Comparaison de l'évolution de la variation de fluorescence, en tenant compte de l'excitation et de l'inhibition, entre les dix premiers chocs du premier cycle et les dix derniers chocs du dernier cycle. La valeur de  $\Delta F/F_0$  a été normalisée par rapport à sa valeur pour les dix premiers chocs ( $n = 16$ ,  $p < 0.01$  post correction Bonferroni). (D) Comparaison de l'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence basale de la sonde ArcLight entre le moment  $t_i$  qui correspond aux dix premiers chocs du premier cycle et  $t_f$  qui correspond aux dix derniers chocs du dernier cycle. ( $n = 16$ , non significatif, post correction Bonferroni). Pour (B), (C) et (D), la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) sont représentées.

La même expérience et le même type de quantification ont également été menés en parallèle sur des drosophiles exprimant la sonde voltage ArcLight. La figure 5.18A montre une nette augmentation de l'excitation entre les dix premiers chocs du premier cycle et les dix derniers chocs du dernier cycle. On remarque également la disparition du pic correspondant au processus d'inhibition des neurones ( $\Delta F/F_0 > 0$ ) entre les premières et les dernières stimulations. L'augmentation du processus d'excitation a été quantifiée sur 16 drosophiles. Le

résultat est présenté sur la figure 5.18B. On observe une augmentation significative d'environ 40% de la réponse entre les dix premiers chocs de la première série et les dix derniers chocs de la dernière série. La figure 5.18C correspond à la quantification à la fois de l'augmentation de l'excitation et de la diminution de l'inhibition lors de stimulations répétées. Elle montre une augmentation d'un facteur 2.5 du rapport "réponse excitatrice sur réponse inhibitrice" entre les dix premiers et les dix derniers chocs. Là encore, la stabilité de l'intensité de fluorescence basale a été étudiée et aucun phénomène de photoblanchiment significatif n'a été observé (figure 5.18D). Les sondes calcique et voltage donnent donc accès à des informations qui semblent au premier abord contradictoires. La sonde voltage permet de voir un effet que l'on pourrait assimiler à une sensibilisation caractérisée par une augmentation de la partie excitatrice et une diminution de la partie inhibitrice de la réponse. Au contraire, la sonde calcique reflète plutôt un effet de désensibilisation avec une diminution de la réponse excitatrice.

Différents mécanismes peuvent néanmoins conduire à la décorrélation du niveau de calcium intracytoplasmique et de l'activité neuronale électrique.

La mobilisation des réserves de calcium intracellulaire au cours de l'activité neuronale peut être une des raisons. Afin d'étudier son rôle au niveau de la réponse des corps pédonculés à des stimulations électriques, j'ai utilisé la molécule de thapsigargine qui a pour effet de vider les réserves de calcium intracellulaire. Cette molécule bloque les pompes SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) au niveau de la membrane des réserves afin d'empêcher le repompage du calcium dans celles-ci. Elle permet donc à terme de vider les réserves de calcium intracellulaire qui sont évacuées dans le milieu extracellulaire. Le protocole exact est décrit à la partie 5.1.3.3. Les drosophiles exprimant la sonde calcique G-CaMP6f ont été stimulées avec quatre séries de 50 chocs de 50 ms et 80  $\mu\text{A}$ . La thapsigargine a ensuite été rajoutée dans le liquide physiologique de manière à avoir une concentration finale en thapsigargine de 25  $\mu\text{M}$  pendant 30 minutes. Après rinçage de la thapsigargine, les drosophiles ont été stimulées à nouveau avec les quatre mêmes séries de 50 chocs. Les réponses avant et après l'application de la thapsigargine sur le cerveau de la drosophile ont été comparées. Pour les drosophiles ayant été traitées à la thapsigargine, on observe une forte diminution de la réponse (figure 5.19B) alors que la réponse des mouches "contrôle", c'est-à-dire les mouches n'ayant pas été mises en contact avec la thapsigargine (mais qui ont néanmoins subi l'ajout du solvant DMSO ainsi que la suppression transitoire du  $\text{CaCl}_2$  dans le liquide physiologique) reste pratiquement stable (figure 5.19A). La figure 5.19C montre une diminution significative d'un facteur 8 de la réponse calcique des drosophiles traitées à la thapsigargine par rapport aux drosophiles utilisées comme contrôle. Le rapport  $R_+/R_-$  a été quantifié où les notations  $R_-$  et  $R_+$  correspondent respectivement aux intensités de réponse avant et après le traitement pharmacologique. De plus, comme montré sur la figure 5.19D, l'étude de la variation de fluorescence pour les séries successives de chocs électriques montre qu'après traitement des drosophiles à la thapsigargine, l'intensité de réponse  $\Delta F/F_0$  ne diminue plus au fur et à mesure des stimulations, alors que pour les mouches non traitées à la thapsigargine, l'effet de désensibilisation, présenté précédemment, persiste. En utilisant la thapsigargine afin de vider de façon massive les réserves de calcium intracellulaire, on observe une baisse significative de la réponse ainsi qu'une disparition de la désensibilisation au fil des stimulations successives. Ainsi, le phénomène de désensibilisation observé avec la

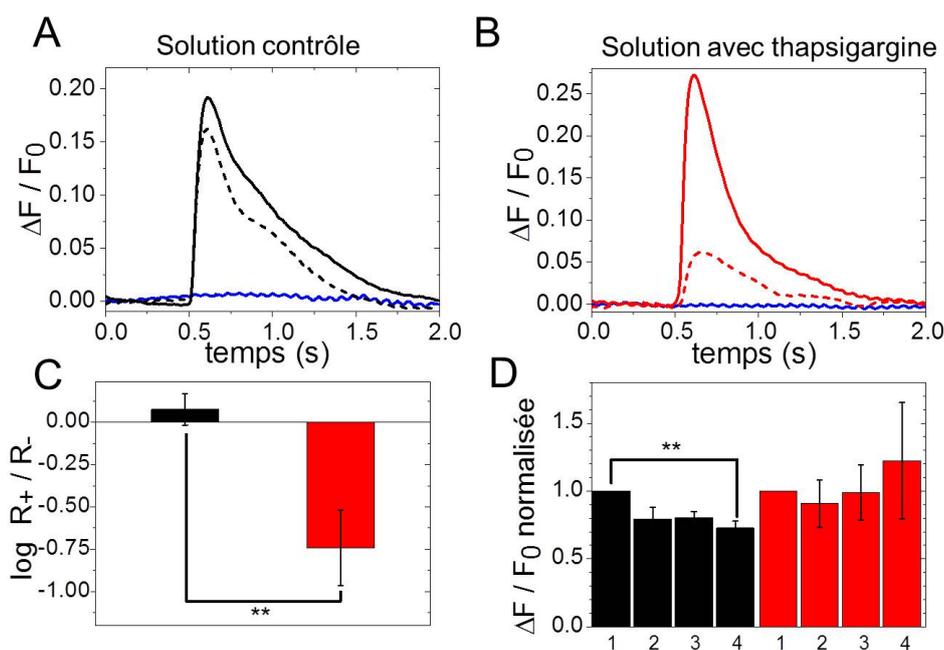


FIGURE 5.19 – Effet de l’application temporaire de thapsigargine sur la réponse calcique aux stimulations électriques. (A) Réponse moyenne pour 200 stimulations sur les drosophiles contrôle avant (courbe noire en trait plein) et après (courbe noire en trait pointillé) application de la solution physiologique “contrôle” contenant 0.05% de DMSO en volume et privée temporairement de  $\text{CaCl}_2$ . (B) Réponse moyenne pour 200 stimulations sur les drosophiles avant (courbe rouge en trait plein) et après (courbe rouge en trait pointillé) application temporaire de thapsigargine diluée à une concentration de  $25 \mu\text{M}$  dans le liquide physiologique contenant 0.05% de DMSO en volume et privé de  $\text{CaCl}_2$ . Pour (A) et (B), les courbes bleues correspondent à la variation de fluorescence en l’absence de stimulation. (C) Diagramme montrant l’évolution du rapport de la réponse aux chocs électriques après et avant l’application du traitement : solution contrôle (en noir) ou solution contenant la thapsigargine (en rouge). Les intensités de réponse sont calculées en moyennant 200 réponses individuelles. (D) Diagramme montrant l’évolution de la variation de fluorescence pour quatre cycles de stimulation après traitement avec la solution contrôle (en noir) et avec la solution de thapsigargine (en rouge). Pour (C) et (D),  $n = 10$  mouches contrôle,  $n = 9$  mouches traitées à la thapsigargine.  $p < 0.01$ , post correction Bonferroni. La moyenne et l’erreur standard de la moyenne (SEM) sont représentées.

sonde calcique G-CamP6f pourrait tirer son origine de l’épuisement des réserves de calcium intracellulaire au cours des différentes stimulations.

### 5.3 Résultats : Exploration, avec la sonde voltage ArcLight, du rôle des neurones GABAergiques et dopaminergiques dans la transmission du choc électrique.

Afin d'étudier les voies de signalisation des stimulations de type punitif au niveau des corps pédonculés, la sonde voltage ArcLight semble être un bon candidat du fait de sa rapidité à retranscrire les phénomènes d'excitation et de désexcitation en comparaison des sondes calciques génétiquement encodées traditionnellement utilisées. De plus, de part le caractère biphasique du signal de réponse en fluorescence, cette sonde donne accès à la fois à l'excitation des neurones (pour  $\Delta F/F_0 < 0$ ) mais aussi à leur inhibition (pour  $\Delta F/F_0 > 0$ ) ce qui n'est pas le cas des sondes calciques. Pour cette expérience, des lignées de drosophiles exprimant simultanément le rapporteur d'activité ArcLight et des transgènes permettant de déréguler l'expression de récepteurs spécifiques de neurotransmetteurs, ont été utilisées. Nous ne visons pas l'étude exhaustive de tous les récepteurs impliqués dans le circuit de l'information punitive jusqu'aux neurones des corps pédonculés, mais cette étude a pour but de démontrer l'apport d'une approche optique pour l'électrophysiologie *in vivo*. Par exemple, nous avons utilisé des lignées surexprimant le récepteur GABA<sub>A</sub> (gène RDL chez la drosophile, pour "Resistance to Dieldrin Locus") dans les neurones  $\alpha/\beta$ . Leur génotype est *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-RDL<sup>HA</sup>/+*, où + désigne un chromosome "normal" de la souche de référence Canton S (CS). Nous avons également utilisé des lignées pour lesquelles l'expression du récepteur dopaminergique DAMB est réduite par interférence ARN. Leur génotype est *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>* où *UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>* est un transgène qui permet l'expression d'un ARN interférant contre le récepteur DAMB dans les neurones des corps pédonculés exprimant le facteur de transcription GAL4. La lignée contrôle a pour génotype *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+*. Les différentes lignées de drosophiles utilisées dans l'exploration, avec la sonde voltage ArcLight, du rôle des neurones GABAergiques et dopaminergiques dans la transmission du choc électrique jusqu'aux neurones des corps pédonculés, sont résumées dans le tableau 5.3.

Génotypes	Caractéristiques
<i>C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup></i>	Réduction du nombre de récepteurs dopaminergiques DAMB
<i>C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-RDL<sup>HA</sup>/+</i>	Surexpression du récepteur GABAergique GABA <sub>A</sub>
<i>C739-GAL4, UAS-ArcLight/+;</i>	Lignée contrôle

Tableau 5.3 – Tableau récapitulatif des lignées de drosophiles utilisées pour l'étude des neurones dopaminergiques et GABAergiques avec la sonde voltage ArcLight.

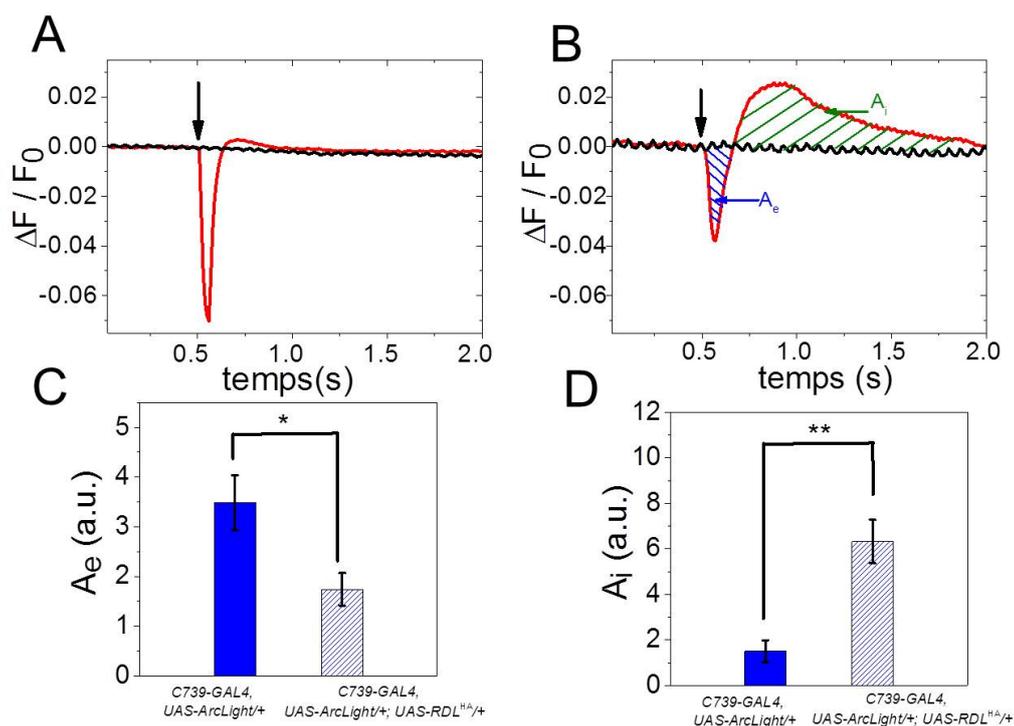


FIGURE 5.20 – Rôle du neurotransmetteur GABA dans la transmission de l'information de la stimulation électrique au niveau des corps pédonculés, étudié à l'aide de la sonde voltage ArcLight. (A) Réponse typique d'une drosophile contrôle *C739-GAL4*, *UAS-ArcLight/+* à 50 stimulations de 50 ms et 80  $\mu$ A. (B) Réponse typique d'une drosophile *C739-GAL4*, *UAS-ArcLight/+* ; *UAS-RDL<sup>HA</sup>/+* à 50 stimulations de de 50 ms et 80  $\mu$ A. Pour (A) et (B), la flèche indique l'envoi de la stimulation. (C) Comparaison de l'aire de la partie excitatrice de la réponse (notée  $A_e$ ) à 50 stimulations pour les drosophiles contrôle *C739-GAL4*, *UAS-ArcLight/+* et les drosophiles *C739-GAL4*, *UAS-ArcLight/+* ; *UAS-RDL<sup>HA</sup>/+*. (D) Comparaison de l'aire de la partie inhibitrice de la réponse (notée  $A_i$ ) à 50 stimulations pour les drosophiles contrôle *C739-GAL4*, *UAS-ArcLight/+* et les drosophiles *C739-GAL4*, *UAS-ArcLight/+* ; *UAS-RDL<sup>HA</sup>/+*. Pour (C) et (D),  $n = 11$  drosophiles contrôle *C739-GAL4*, *UAS-ArcLight/+*,  $n = 13$  drosophiles *C739-GAL4*, *UAS-ArcLight/+* ; *UAS-RDL<sup>HA</sup>/+*. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) sont représentées. La définition de  $A_e$  et  $A_i$  est représentée sur la figure (B).

### 5.3.1 Étude du rôle du récepteur GABA<sub>A</sub> dans la réponse aux chocs électriques

Pour les mouches “sauvages” *C739-GAL4*, *UAS-ArcLight/+*, les courbes de réponse aux stimulations électriques observées avec la sonde voltage ArcLight présentent un pic initial excitateur suivi d'une composante inhibitrice longue (figure 5.18A). Il existe différents mécanismes conduisant à l'inhibition des neurones. L'inhibition peut provenir du neurone lui-même. Ce type de mécanisme se produit très rapidement car il repose sur l'ouverture de canaux membranaires. L'apparition tardive du pic d'inhibition observé ne semble donc pas être en faveur de ce mécanisme. Une autre possibilité est une inhibition des neurones de type  $\alpha/\beta$  par d'autres

## Chapitre 5. Électrophysiologie optique alliant imagerie HiLo haute cadence et biosenseurs fluorescents ultra-rapides

neurones, appelés neurones GABAergiques. Chez les mammifères comme chez les insectes, il existe un équilibre de concentrations entre excitation et inhibition des neurones [206]. Il s'agit d'un équilibre chimique principalement entre deux neurotransmetteurs : le glutamate qui a un effet excitateur et l'acide carboxylique  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), qui joue un rôle inhibiteur dans le système nerveux [207]. Un déséquilibre entre ces neurotransmetteurs peut notamment conduire à des maladies comme l'épilepsie. Les deux familles de récepteurs au GABA identifiées à la fois chez les vertébrés et les invertébrés sont :

- des récepteurs ionotropiques : GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>C</sub> ;
- des récepteurs métabotropiques : GABA<sub>B</sub>.

Un récepteur ionotropique GABA<sub>A</sub>, après fixation des molécules de GABA, subit un changement de conformation ce qui rend la membrane plasmique perméable aux ions chlorure Cl<sup>-</sup>. Ces ions chlorure entrent alors dans le neurone, ce qui crée une hyperpolarisation d'où le qualificatif d'inhibiteur pour le neurotransmetteur GABA. Le rôle du GABA et des récepteurs ionotropiques GABA<sub>A</sub> a déjà été intensément étudié chez les insectes dans le cas de réponses à des stimulations olfactives. Par exemple, chez le papillon de nuit [208], ils régulent l'information olfactive entrante au niveau des glomérules des lobes antennaires. Chez la drosophile également, le rôle des neurones GABAergiques est connu dans le circuit de l'information olfactive [26] et pour les processus cognitifs d'apprentissage et de mémorisation [209, 210]. Une paire de neurones GABAergiques, les neurones APL (Anterior Paired Lateral) innervent intensément l'ensemble des corps pédonculés. Il existe un équivalent de ces neurones APL chez d'autres insectes comme la sauterelle où il sont nommés "Giant GABAergic Neuron" (GGN) et où leur rôle a été prouvé dans l'inhibition des corps pédonculés [211]. La réponse aux odeurs est grandement régulée par les neurones GABAergiques, conduisant à un encodage épars de l'information au niveau des corps pédonculés (chez la drosophile adulte [197], chez la drosophile à l'état larvaire [212] ou chez l'abeille [213]), maximisant par exemple la capacité de discriminer différentes odeurs entre elles. Une diminution du nombre de récepteurs GABA<sub>A</sub> conduit à une augmentation de la population des neurones des corps pédonculés répondant à la stimulation olfactive. Il est donc clair que le GABA joue un rôle important dans le cas des stimulations olfactives, mais ce rôle est moins clair pour les stimulations punitives de type micro-chocs électriques.

Afin d'étudier le rôle du neurotransmetteur GABA dans la voie de signalisation des chocs électriques vers les corps pédonculés, la réponse de drosophiles pour lesquelles le nombre de récepteurs GABAergiques a été augmenté est comparée à la réponse de drosophiles contrôle. Chez la drosophile, le gène le mieux caractérisé qui encode les récepteurs de type GABA<sub>A</sub> et qui est largement exprimé au sein des neurones des corps pédonculés est le gène RDL. Les figures 5.20A et B montrent la différence de forme de la réponse entre les drosophiles contrôle *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+* et les drosophiles *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+ ; UAS-RDL<sup>HA</sup>/+*. La partie excitatrice de la réponse aux chocs est moins importante pour les mouches surexprimant le récepteur au GABA et la contribution inhibitrice est quant à elle plus grande en comparaison des mouches contrôle. Le résultat de la quantification des aires des parties excitatrice ( $A_e$ ) et inhibitrice ( $A_i$ ) est présenté sur les figures 5.20C et D. On observe à la fois une diminution significative de l'excitation et une augmentation significative de l'inhibition pour les drosophiles

surexprimant le récepteur GABAergique  $GABA_A$ , laissant envisager un rôle du neurotransmetteur GABA dans le circuit d'information des stimulations de type électrique vers les corps pédonculés.

### 5.3.2 Étude du rôle du récepteur dopaminergique DAMB dans la réponse aux chocs électriques

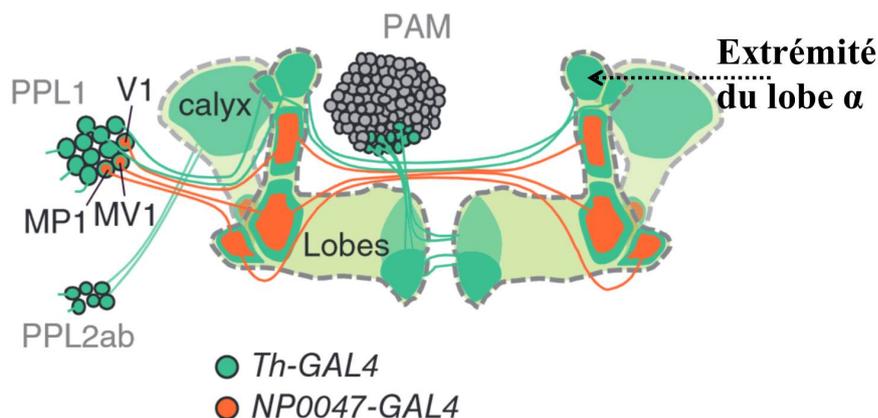


FIGURE 5.21 – Représentation schématique de l'interconnexion entre les corps pédonculés et les neurones dopaminergiques. Le pilote d'expression *Th-GAL4* exprime le rapporteur dans tous les neurones des groupements PPL1 et PPL2ab ainsi que dans douze neurones du groupement PAM. Ces neurones sont représentés en vert foncé. Le pilote *NP0047-GAL4* exprime le rapporteur dans trois neurones dopaminergiques : V1, MV1 et MP1 du groupement PPL1, représentés en orange. La figure est adaptée de [214].

Chez la drosophile, le transport de l'information électrique jusqu'aux corps pédonculés a été beaucoup moins étudié que les stimulations olfactives. Néanmoins, il est connu que ce sont des neurones dopaminergiques [215] qui forment le dernier relai de l'information punitive avant les corps pédonculés, qui apparaissent ainsi comme le point de convergence entre les informations olfactives et tactiles douloureuses [24]. La dopamine est un neurotransmetteur très important autant chez les vertébrés que chez les invertébrés. Chez les mammifères, elle joue un rôle crucial dans le contrôle locomoteur, la motivation, la mémoire, l'attention et l'éveil. Un dysfonctionnement du système dopaminergique peut conduire à des désordres psychiatriques comme la dépression, la schizophrénie ou encore la maladie de Parkinson. Chez les invertébrés, comme la drosophile, la dopamine est aussi impliquée dans la locomotion [216], l'éveil [217, 218], la motivation, le sommeil [219] et la cognition [220]. Il a été montré [221] que les neurones dopaminergiques sont impliqués à la fois dans l'apprentissage aversif et appétitif [222]. Cela met en défaut une théorie précédemment développée tendant à séparer les circuits de la punition et de la récompense en terme de neurotransmetteurs [223]. La dopamine est synthétisée dans environ 600 neurones dopaminergiques. Les corps cellulaires de ces neurones dopaminergiques sont organisés en 15 groupements [224]. On compte parmi eux le groupement PPL1 regroupant 12 neurones dopaminergiques ou encore le groupement

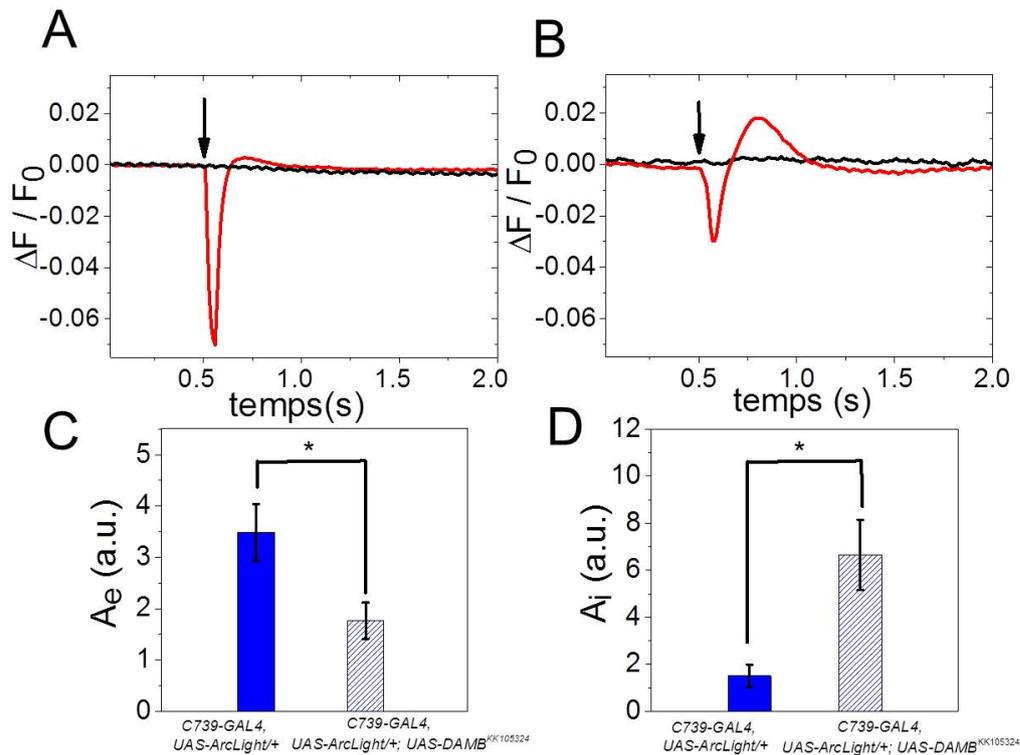


FIGURE 5.22 – Rôle du récepteur dopaminergique DAMB dans la transmission de l’information de la stimulation électrique au niveau des corps pédonculés, étudié à l’aide de la sonde voltage ArcLight. (A) Réponse typique d’une drosophile *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+* à 50 stimulations de 50 ms et 80  $\mu$ A. (B) Réponse typique d’une drosophile *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+ ; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>* à 50 stimulations de 50 ms et 80  $\mu$ A. Pour (A) et (B), la flèche indique l’envoi de la stimulation. (C) Comparaison de l’aire de la partie excitatrice de la réponse (notée  $A_e$ ) à 50 stimulations pour les drosophiles contrôle *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+* et les drosophiles *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+ ; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>*. (D) Comparaison de l’aire de la partie inhibitrice de la réponse (notée  $A_i$ ) à 50 stimulations pour les drosophiles contrôle *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+* et les drosophiles *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+ ; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>*. Pour (C) et (D),  $n = 11$  drosophiles contrôle *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+*,  $n = 13$  drosophiles *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+ ; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>*. La moyenne et l’erreur standard de la moyenne (SEM) sont représentées.

PAM [215, 220, 225, 226, 227]. Il a été plus particulièrement démontré que le groupement PPL1, dont certains neurones projettent sur les corps pédonculés (figure 5.21), joue un rôle de renforcement du signal punitif lors des conditionnements olfactifs aversifs [214, 225]. Les neurones nommés MP1 et MV1 du groupement de neurones dopaminergiques PPL1 sont également impliqués dans l’oubli [228]. Il a aussi été démontré que les neurones du groupement PAM relaient l’information de stimulations appétitives lors de conditionnements associatifs [222]. Certains récepteurs dopaminergiques au niveau des corps pédonculés [229] dont les récepteurs de type D1, en présence de dopamine, activent l’adenylyl cyclase conduisant à une augmentation de la concentration intracellulaire de l’AMP cyclique [230, 231]. Un des

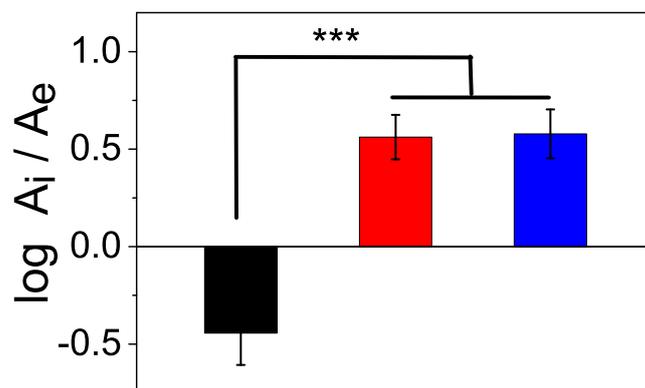


FIGURE 5.23 – Comparaison du rapport des aires inhibitrice ( $A_i$ ) et excitatrice ( $A_e$ ) en réponse à 50 chocs de 50 ms et  $80 \mu\text{A}$  pour trois génotypes : *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+* ( $n = 11$ , en noir), *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>* ( $n = 13$ , en rouge) et *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-RDL<sup>HA</sup>* ( $n = 13$ , en bleu).  $p < 0.001$ , post correction Bonferroni. La moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM) sont représentées.

récepteurs dopaminergiques, de type D1, nommé dDA1, est essentiel pour l'acquisition de la mémoire aversive ou appétitive [202]. Un autre récepteur dopaminergique de type D1, appelé DAMB (aussi connu sous le nom DopR99B) [230, 232], a été étudié chez la larve de drosophile et s'est révélé nécessaire à la formation de la mémoire olfactive aversive [233]. Le récepteur DAMB joue aussi un rôle dans la mémoire à long terme aversive chez la drosophile adulte (communication personnelle T. Préat), qui se forme dans les neurones  $\alpha/\beta$  des corps pédonculés [17] et dans la mémoire à long terme appétitive [234]. Le rôle de ce récepteur dopaminergique DAMB a été peu étudié dans le cas de la transmission de l'information d'une stimulation punitive vers les corps pédonculés de la drosophile adulte.

Une expérience similaire à celle menée sur les drosophiles de lignées *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-RDL<sup>HA</sup>/+*, surexprimant le récepteur  $\text{GABA}_A$ , a été menée sur les drosophiles de lignée *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>* pour lesquelles un transgène permet l'expression d'un ARN interférant inhibant l'expression des récepteurs dopaminergiques de type DAMB. On observe là encore, sur la figure 5.22, une diminution significative de l'excitation, ce qui est l'effet attendu si le récepteur DAMB est bien impliqué dans la transmission de l'information punitive aux corps pédonculés. De façon plus surprenante, on observe de nouveau une augmentation de la composante inhibitrice. La figure 5.23 résume les résultats obtenus pour les deux génotypes d'intérêt : *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-DAMB<sup>KK105324</sup>* et *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+; UAS-RDL<sup>HA</sup>* en comparaison des drosophiles contrôle *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+*. Le rapport  $\frac{A_i}{A_e}$ , où  $A_i$  et  $A_e$  correspondent respectivement aux aires des contributions excitatrice et inhibitrice, y est significativement augmenté dans les deux cas par rapport aux drosophiles contrôle.

## 5.4 Résultats préliminaires : Cartographie spatiale de la réponse aux chocs électriques dans le lobe $\alpha$

Les résultats présentés précédemment dans ce chapitre correspondent tous à des études globales de la réponse de l'ensemble des neurones au sein du lobe  $\alpha$  des corps pédonculés. L'utilisation de la microscopie HiLo, capable de sectionnement optique, permet néanmoins d'aller plus loin dans l'analyse de la réponse des neurones à une stimulation. En effet, en s'affranchissant de la fluorescence provenant des plans qui ne sont pas au point, il est possible d'étudier la réponse à des stimulations d'un sous-ensemble de neurones, et ce simultanément pour toutes les cellules sélectionnées. Même si la résolution temporelle n'atteint pas celle de l'électrophysiologie classique, le grand avantage de l'optique est la possibilité d'étudier en parallèle une grande population de neurones. Je me suis alors plus particulièrement intéressée à la réponse aux chocs électriques au niveau d'une section du lobe  $\alpha$  des corps pédonculés, zone au niveau de laquelle sont fasciculés environ 1000 axones de diamètre de l'ordre de 200 nm. Les résultats présentés dans cette partie sont préliminaires et concernent des drosophiles de génotype *C739-GAL4, UAS-ArcLight/+*. Pour le détail du traitement des données de cette partie, il faut se référer à la section 5.1.4.3.

### 5.4.1 Microscopie HiLo pour l'étude locale de la réponse des neurones au niveau de leurs projections axonales

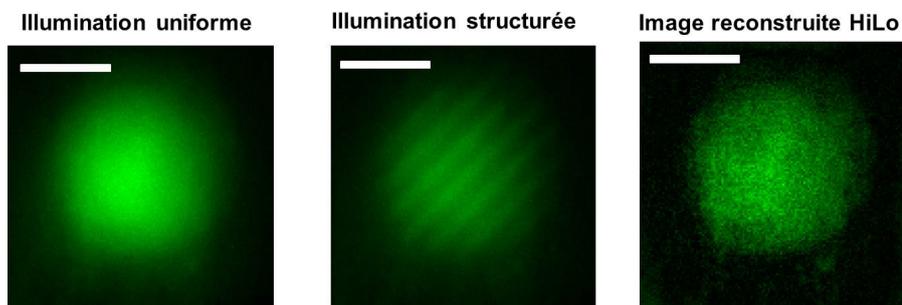


FIGURE 5.24 – Images du lobe  $\alpha$  avec une illumination uniforme, une illumination structurée, et après reconstruction HiLo. Les motifs utilisés pour cette expérience sont ceux présentés sur la figure 5.2. Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Durée d'exposition des images : 5 ms.

La figure 5.24 résume le protocole d'acquisition des images. Deux images du lobe  $\alpha$  sont prises avec deux illuminations différentes : une illumination uniforme et une illumination structurée. L'image sectionnée optiquement est alors reconstruite en utilisant l'algorithme présenté au Chapitre 2. Si l'on suit la variation de fluorescence de manière globale spatialement sur l'ensemble du lobe  $\alpha$  en réponse moyennée sur un cycle de 25 chocs, la réponse obtenue en microscopie plein champ traditionnelle a sensiblement la même forme que celle obtenue par microscopie à illumination structurée HiLo (figure 5.25) avec toutefois une légère augmentation de l'intensité de la réponse excitatrice pour la microscopie HiLo. Si maintenant, on s'intéresse à la variation de fluorescence à l'échelle locale au sein du lobe  $\alpha$ , on constate sur

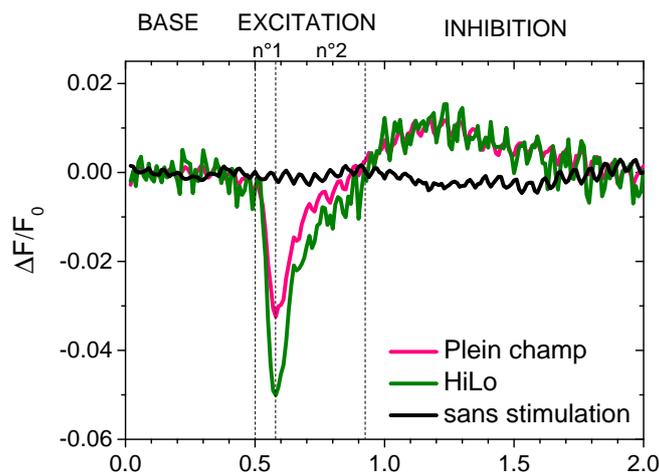


FIGURE 5.25 – Variation de fluorescence de l’ensemble des neurones du lobe  $\alpha$  obtenue en microscopie plein champ et en microscopie HiLo. La courbe est une moyenne de 25 chocs de 50 ms et 80  $\mu\text{A}$ . La stimulation est délivrée à  $t = 0.5$  s.

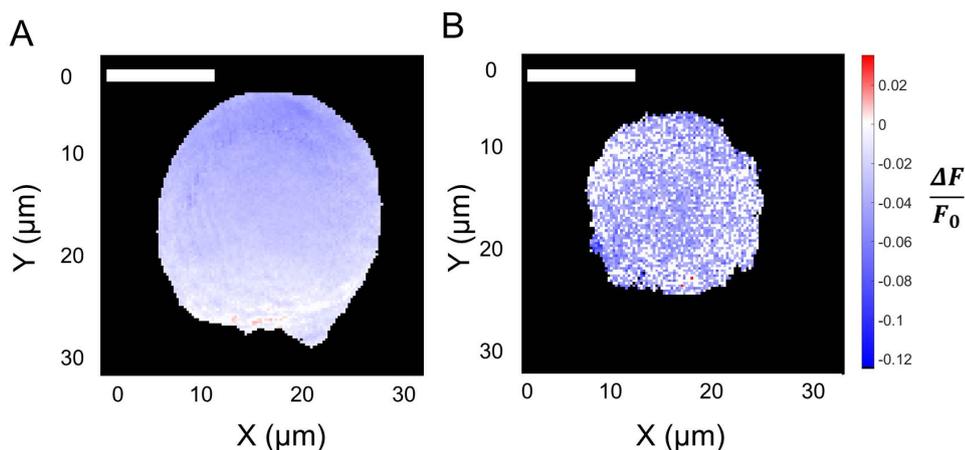


FIGURE 5.26 – (A) Cartographie spatiale plein champ de variation de fluorescence au niveau du lobe  $\alpha$  calculée lors de la première partie de la phase excitatrice de la réponse aux stimulations électriques. (B) Cartographie spatiale HiLo de variation de fluorescence au niveau du lobe  $\alpha$  calculée lors de la première partie de la phase excitatrice de la réponse aux stimulations électriques. La définition des intervalles temporels étudiés est donnée sur la figure 5.12 et est rappelée sur la figure 5.25. Barre d’échelle : 10  $\mu\text{m}$ . Les cartographies ont été établies avec un seuil de  $2.33\sigma$ , c’est-à-dire  $p = 0.01$  (voir section 5.1.4.3).

les figures 5.26A et B que les résultats obtenus en microscopie plein champ diffèrent de ceux obtenus après reconstruction HiLo. Les images présentées correspondent à la première partie de la phase excitatrice en réponse au premier cycle de stimulation observée soit en microscopie plein champ (figure 5.26A) soit en microscopie HiLo (figure 5.26B). Sur l’image acquise en microscopie plein champ, l’ensemble des neurones semblent excités. En effet, 96.5% des pixels

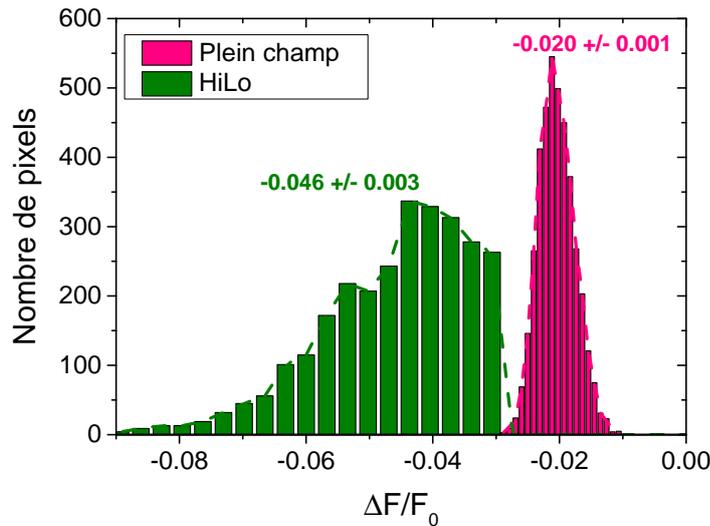


FIGURE 5.27 – Histogramme des valeurs significatives de  $\Delta F/F_0$  durant la première partie de la phase excitatrice en imagerie plein champ et en coupe optique HiLo. Sur cette représentation, le seuil a été pris à  $2.33\sigma$  ( $p < 0.01$ ). Il est indiqué la moyenne et l’erreur standard de la moyenne (SEM) pour les deux distributions.

correspondent à des valeurs de  $\Delta F/F_0$  significativement négatives. Au contraire, l’image HiLo suggère que l’ensemble des neurones n’est pas excité au cours de la stimulation électrique (67% des pixels correspondent à des valeurs de  $\Delta F/F_0$  significativement négatives). La différence de pourcentage de neurones excités obtenue avec les microscopies plein champ et HiLo n’est néanmoins pas une contradiction biologique. En effet, cette différence est due à une capacité de sectionnement optique différentielle entre la microscopie plein champ et la microscopie HiLo. Même si seule une fraction des neurones est excitée, les neurones hors plan de mise au point contribuent grandement au signal observé venant combler les lacunes entre neurones individuels. Cet effet est d’autant plus marqué qu’il est très difficile de placer les axones du lobe  $\alpha$  parfaitement verticaux, dans l’axe de l’imagerie. Cette orientation repose sur un collage délicat de la tête de la drosophile, lors de la préparation de celle-ci à l’imagerie, sans prévisualisation de la fluorescence. On constate de plus, sur la figure 5.27 qu’en microscopie HiLo, la moyenne de  $\Delta F/F_0$  dans la phase d’excitation n°1 est plus importante (en valeur absolue) que pour l’imagerie plein champ. Cet effet est dû à la capacité de coupe de la microscopie HiLo que n’a pas la microscopie plein champ qui intègre alors le signal de fluorescence provenant d’une grande épaisseur dans le cerveau, ce qui “dilue” en partie le signal d’intérêt.

### 5.4.2 Évolution des taux d’excitation et d’inhibition au cours des stimulations

En utilisant la puissance de sectionnement optique de la microscopie HiLo et le constat que la totalité des neurones de type  $\alpha/\beta$  des corps pédonculés n’est pas excitée en réponse à des stimulations électriques, j’ai alors étudié l’évolution du nombre de neurones excités et inhibés

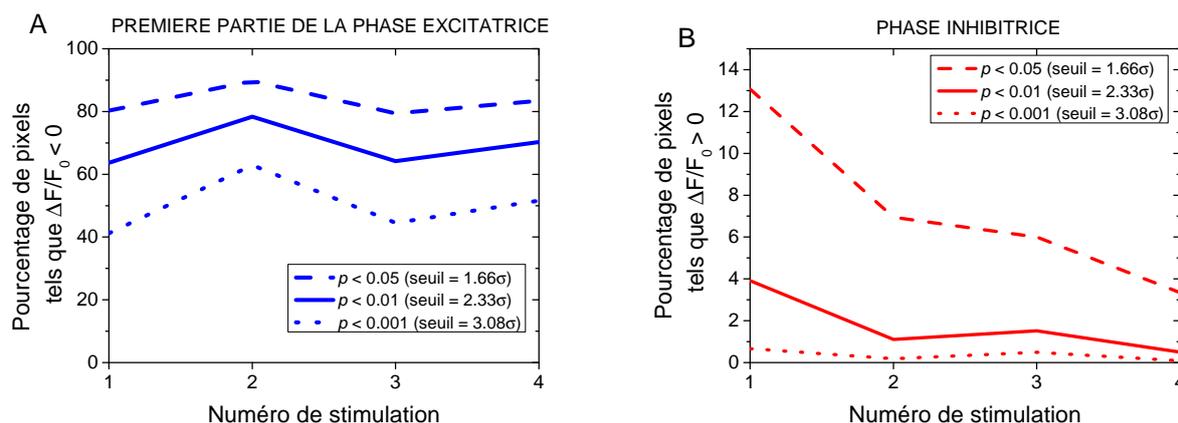


FIGURE 5.28 – Évolution du nombre de pixels excités et inhibés au cours des quatre cycles de stimulation. (A) Évolution du nombre de pixels excités au cours des quatre cycles de stimulation. (B) Évolution du nombre de pixels inhibés au cours des quatre cycles de stimulation. Trois valeurs de seuil sont représentées : 1.66 $\sigma$  ( $p < 0.05$ ), 2.33 $\sigma$  ( $p < 0.01$ ), 3.08 $\sigma$  ( $p < 0.001$ ).

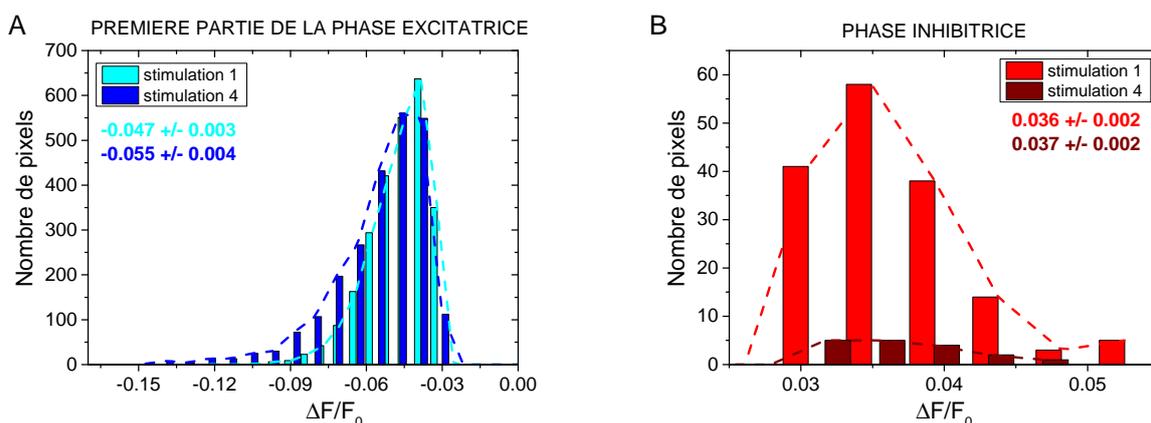


FIGURE 5.29 – Histogrammes des valeurs significatives de  $\Delta F/F_0$  durant les phases excitatrice et inhibitrice pour le premier et le dernier cycle de stimulation. (A) Première partie de la phase excitatrice (B) Phase inhibitrice. Sur cette représentation, le seuil a été pris à 2.33 $\sigma$  ( $p < 0.01$ ). Il est indiqué la moyenne et l’erreur standard de la moyenne (SEM) pour chacune des quatre distributions.

au fur et à mesure de l’envoi des stimulations (4 cycles de 25 chocs de 50 ms et 80  $\mu$ A) pour mieux comprendre le phénomène de “sensibilisation” observé précédemment avec la sonde voltage ArcLight de manière globale (voir section 5.2.2). Les graphiques de la figure 5.28 montrent l’évolution du nombre de neurones recrutés pour l’excitation et l’inhibition au cours des différents cycles de stimulation. Il ne s’agit ici que de résultats préliminaires obtenus avec un petit nombre d’animaux. Dans chacun des cas, excitation et inhibition, sont représentées trois courbes correspondant à différentes valeurs de seuillage statistique. L’excitation a été déterminée uniquement dans la première phase (notée b-c sur la figure 5.12 et n°1 sur la figure 5.25). On remarque tout d’abord que les pourcentages de pixels excités et inhibés dépendent du seuil

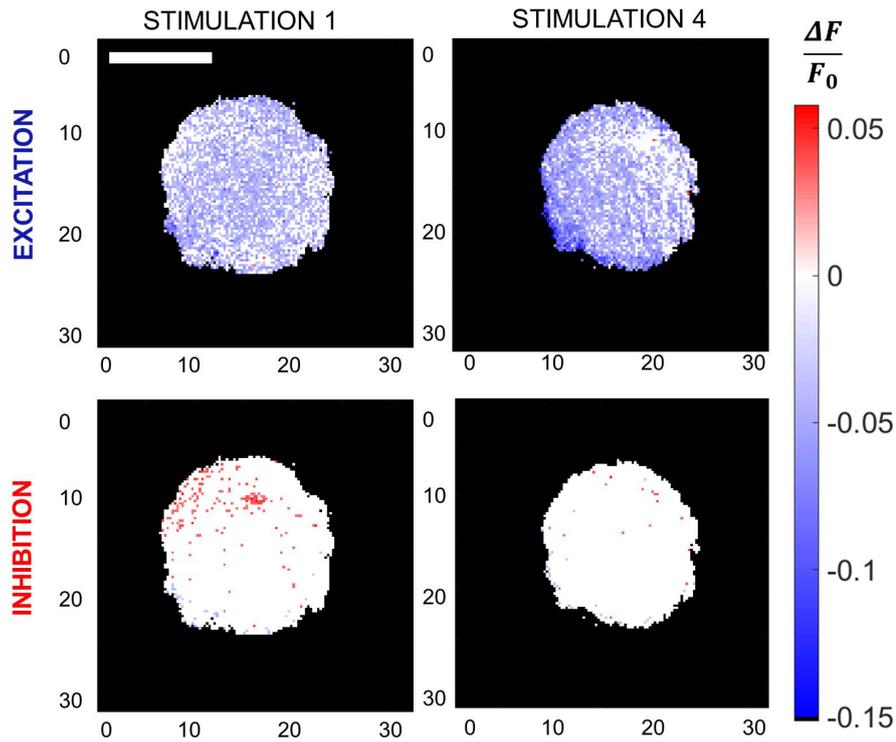


FIGURE 5.30 – Cartographies spatiales HiLo du lobe  $\alpha$  lors de différentes phases de stimulation : excitation et inhibition pour les premier et quatrième cycles de stimulation. Barre d'échelle :  $10 \mu\text{m}$ . Les cartographies ont été établies avec un seuil de  $2.33\sigma$ , c'est-à-dire  $p < 0.01$ .

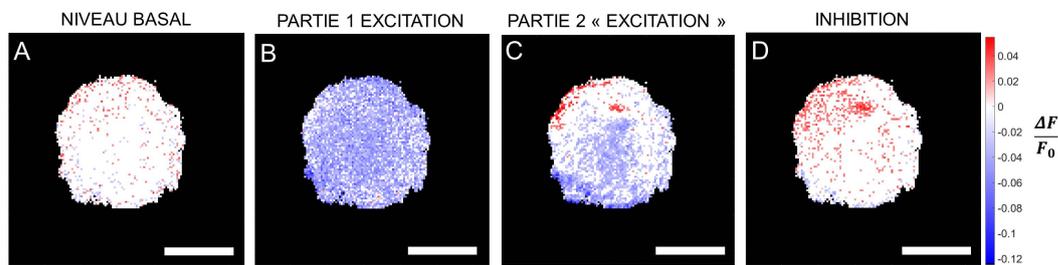


FIGURE 5.31 – Cartographies spatiales HiLo du lobe  $\alpha$  lors de différentes phases : avant la stimulation (A), première partie de l'excitation (B), deuxième partie de l'excitation (C) et inhibition (D). Barre d'échelle :  $10 \mu\text{m}$ . Les cartographies ont été établies avec un seuil de  $1.66\sigma$ , c'est-à-dire  $p < 0.05$ .

de probabilité défini et qu'il faut donc être très prudent en les employant. Dans tous les cas ici, le nombre de neurones excités varie peu entre la première et la dernière stimulation tandis que le pourcentage de neurones participant à l'inhibition chute. La sensibilisation ne semble donc pas provenir d'un nombre accru de neurones participant à l'excitation. Afin de déterminer si cet effet provient d'une réponse individuelle plus forte des neurones participant à l'excitation, des histogrammes représentant la répartition des pixels, en termes de  $\Delta F/F_0$ , durant la première partie de la phase excitatrice et la phase inhibitrice pour le premier et le dernier cycle de stimulations ont été tracés (figure 5.29). On constate que la réponse excitatrice moyenne

## Chapitre 5. Électrophysiologie optique alliant imagerie HiLo haute cadence et biosenseurs fluorescents ultra-rapides

par neurone augmente peu entre le premier et le quatrième cycle de stimulation (figure 5.29A). En ce qui concerne le processus d’inhibition, on n’observe pas une diminution de l’intensité de l’inhibition individuellement subie par chacun des neurones  $\alpha/\beta$  mais une diminution du nombre de neurones inhibés (figure 5.29B). La figure 5.30 représente les cartographies de réponse pour les premier et quatrième cycles de stimulation pour les phases excitatrice (première partie “b-c”) et inhibitrice (“d-e”) de la réponse. On retrouve sur cette figure la diminution de l’étendue spatiale occupée par les neurones inhibés. Sur la figure 5.31, on constate que durant la deuxième phase de l’excitation, il y a à la fois des pixels excités et inhibés. Cet effet, dont l’origine principal semble être une rapidité insuffisante de la sonde voltage ArcLight, sera discuté dans la section 5.5.5.

### 5.4.3 Colocalisation des pixels excités et inhibés

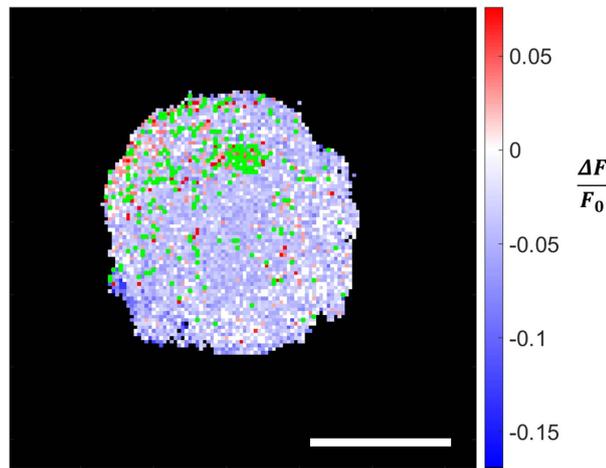


FIGURE 5.32 – Cartographie spatiale HiLo du lobe  $\alpha$  en excitation (bleu,  $\Delta F/F_0 < 0$ ) et en inhibition (rouge,  $\Delta F/F_0 > 0$ ) pour le premier cycle de stimulation. Les pixels blancs correspondent à des valeurs de  $\Delta F/F_0$  non significatives pour une valeur de  $\sigma = 1.66$  ( $p < 0.05$ ). Les points verts correspondent aux pixels présentant une variation de fluorescence à la fois négative durant la phase “b-c” puis positive durant la phase “d-e”.

Il serait également intéressant de savoir si les neurones qui participent à l’excitation et ceux qui sont inhibés sont les mêmes ou correspondent à des sous-populations différentes de neurones de type  $\alpha/\beta$ . Les cartographies d’excitation et d’inhibition ont alors été superposées comme représenté sur la figure 5.32. On constate qu’environ la moitié des pixels inhibés durant la phase “d-e” étaient également excités durant la phase d’excitation “b-c”. Il semble donc y avoir des neurones qui participent à l’excitation, d’autres à l’inhibition et certains à la fois à l’excitation et à l’inhibition. Néanmoins, il est difficile de tirer des conclusions en termes de population de neurones avec ces résultats trop préliminaires. En effet sur ces cartographies, il n’y a pas de correspondance entre un pixel et un axone de neurone. Dans notre configuration, un axone est plutôt imagé sur 4 à 6 pixels adjacents. Il faudrait alors analyser de manière plus fine les cartographies et non pixel à pixel.

## 5.5 Discussion

### 5.5.1 Positionnement des temps de réponse mesurés des sondes G-CaMP6f et ArcLight par rapport aux autres systèmes

Les expériences de caractérisation des sondes calcique G-CaMP6f et voltage ArcLight ont été réalisées directement *in vivo* en suivant la réponse à une stimulation au niveau des corps pédonculés de la drosophile adulte. La stimulation choisie consiste en l'envoi de micro-chocs électriques dont on peut fixer la durée, aussi courte que désirée, afin de déterminer proprement les temps de réponse des rapporteurs optiques de l'activité neuronale. Les temps de réponse déterminés pour la sonde calcique G-CaMP6f sont de 70 ms pour le temps de réponse en excitation et d'environ 400 ms pour le temps de retour au niveau de base (figure 5.16D et tableau 5.2). Dans la littérature, on trouve des valeurs comparables, 70 ms et 460 ms respectivement pour les temps de montée et de décroissance, déterminées non *in vivo* mais sur des cultures de neurones [235]. Ces temps caractéristiques sont très grands en comparaison de ce qui peut être obtenu avec des sondes fluorescentes synthétiques telles que l'Oregon Green BAPTA 1, où les constantes temporelles sont plutôt de l'ordre de la milliseconde pour l'excitation et de la centaine de millisecondes pour le retour à l'état basal. Toutefois, ces temps caractéristiques sont obtenus pour des neurones en culture, en réponse à un potentiel d'action unique. Dans notre cas, la réponse analysée vient d'une population d'axones, et le nombre de potentiels d'action engendrés par l'excitation avec un micro-choc électrique est de plus inconnu. La limitation des sondes synthétiques est qu'elles ne permettent pas un marquage spécifique des cellules d'intérêt. Les signaux physiologiques calciques se déroulent sur des constantes de temps qui peuvent descendre jusqu'à la milliseconde pour l'excitation et entre 10 et 100 ms pour le retour à l'état basal. La dynamique des indicateurs calciques peut donc limiter fortement la capacité de ces sondes à suivre correctement des événements neuronaux rapides car ce n'est qu'après plusieurs potentiels d'action que l'on observe la réponse calcique. La sonde voltage étudiée ArcLight présente des temps caractéristiques très inférieurs à ceux obtenus avec la sonde G-CaMP6f : 13 ms pour le temps de réponse à l'excitation et 40 ms pour le temps de retour à l'état de base (figure 5.16D et tableau 5.2). Ces temps ont été précédemment déterminés dans des cellules HEK 293 [65, 236] pour lesquelles des temps de réponse comparables ont été mesurés : 10 ms pour le temps de réponse à l'excitation et 50 ms pour le temps de retour à l'état basal.

Un article très récent [237] présente une comparaison de l'utilisation des sondes calcique G-CaMP6f et voltage ArcLight pour l'étude de la réponse à une stimulation olfactive au niveau des bulbes olfactifs d'une souris. Les temps caractéristiques de réponse mesurés pour la réponse à l'excitation sont de 150 ms pour la sonde calcique G-CaMP6f et 100 ms pour la sonde voltage ArcLight. Pour le temps de retour à l'état basal, ils obtiennent 650 ms pour la sonde G-CaMP6f et 200 ms pour la sonde voltage ArcLight. Ces valeurs sont largement plus grandes que celles que j'ai déterminées. Néanmoins, mes expériences, comme celles présentées dans [237], ne sont pas des caractérisations physiques fines des sondes à proprement parler. En effet, les temps caractéristiques mesurés incluent la durée de stimulation, qui a été dans mon cas réduite au maximum en utilisant des stimulations électriques très courtes,

## Chapitre 5. Électrophysiologie optique alliant imagerie HiLo haute cadence et biosenseurs fluorescents ultra-rapides

---

tout en gardant une réponse exploitable. Le temps mesuré inclut également l'information moyennée de nombreux neurones, 1000 neurones environ pour le lobe  $\alpha$ , qui peuvent ne pas être parfaitement synchrones, ainsi que le temps de traitement de l'information par les corps pédonculés, qui constituent un centre intégrateur de l'information.

Ces dernières années, des améliorations ont été faites sur la sonde voltage ArcLight en termes de rapidité de réponse en modifiant le domaine sensible au potentiel. Les temps de réponse obtenus sont de l'ordre de 6 ms avec toutefois une diminution de l'amplitude de la réponse en fluorescence par rapport à la sonde originelle [236]. Des senseurs de potentiel basés sur des rhodopsines microbiennes (nommées Arch D95N, Arch3 ou QuasAr) présentent des performances *in vitro* très prometteuses [238, 239, 240] en termes de rapidité, avec des temps de réponse de l'ordre de la milliseconde. Ces rhodopsines bactériennes ont déjà été présentées dans le cadre de la manipulation neuronale par optogénétique dans la section 1.3.2.6 du Chapitre 1 (figure 1.12). La relation entre lumière et potentiel membranaire est ici inversée. En optogénétique, l'excitation lumineuse des archaerhodopsines conduit à un flux de protons à travers la membrane plasmique et donc à un changement du potentiel membranaire, ce qui permet d'inhiber par la lumière les neurones. Ici, la situation est inversée puisque les archaerhodopsines bactériennes sont utilisées en tant que senseur : un changement du potentiel membranaire se répercute sur le signal optique de fluorescence mesuré. Malgré des temps de réponse très attractifs, ces senseurs ont des efficacités quantiques environ cent fois plus faibles que celle de la sonde ArcLight nécessitant une excitation lumineuse très intense non compatible avec les études *in vivo*. D'autres variantes de sonde voltage ont également été proposées conduisant à la création par exemple de la sonde ASAP1 pour "Accelerated Sensor of Action Potentials 1" [241]. Le domaine sensible au voltage de cette sonde de toute dernière génération est une phosphatase extraite du poulet *Gallus gallus*, contrairement à la voltage ArcLight utilisée où la phosphatase provient de l'animal marin *Ciona intestinalis*. Une cinétique de 2 ms est atteinte à la fois pour le temps de réponse à l'excitation et pour le retour à l'état basal, permettant la détection de potentiels d'action individuels et se rapprochant ainsi un peu plus d'une électrophysiologie toute optique. Néanmoins ces performances ont été obtenues *in vitro* et n'ont pas encore été reproduites pour des mesures *in vivo*.

### 5.5.2 Signaux physiologiques *in vivo* et sonde calcique G-CaMP6f

Les réponses à des chocs électriques répétés ont été analysées avec la sonde calcique G-CaMP6f. Une diminution significative de la réponse au fil des stimulations a été observée laissant envisager un phénomène de désensibilisation (figure 5.17). Il a été montré, lors de cette thèse, par des études de "knock-down" moléculaire, que le récepteur dopaminergique DAMB est impliqué dans la transmission de l'information des chocs électriques vers les corps pédonculés de la drosophile puisqu'une diminution du nombre de récepteurs dopaminergiques DAMB conduit à une diminution de la composante excitatrice de la réponse de la sonde voltage ArcLight (figure 5.22). Cette observation semble en accord avec le fait que les drosophiles déficientes en récepteur DAMB au niveau des neurones des corps pédonculés n'évitent pas aussi efficacement les chocs électriques que des drosophiles contrôle [228]. Il est alors intéressant de comprendre le lien entre la désensibilisation observée et le récepteur

dopaminergique DAMB. Un article récent [242], ainsi que des études plus anciennes [232, 243], ont montré que les réserves internes de calcium sont couplés aux récepteurs dopaminergiques DAMB via les récepteurs de la ryanodine. Ces récepteurs sont des canaux calciques insérés dans la membrane du réticulum endoplasmique et sont impliqués dans le relargage du calcium des réserves intracellulaires vers le cytosol. Lorsque la concentration en calcium augmente dans le cytosol, par exemple lors de stimulations électriques par entrée de calcium extracellulaire, ces récepteurs sont activés et laissent sortir du calcium des réserves. Ce mécanisme est appelé CICR pour “Calcium-Induced Calcium Release”.

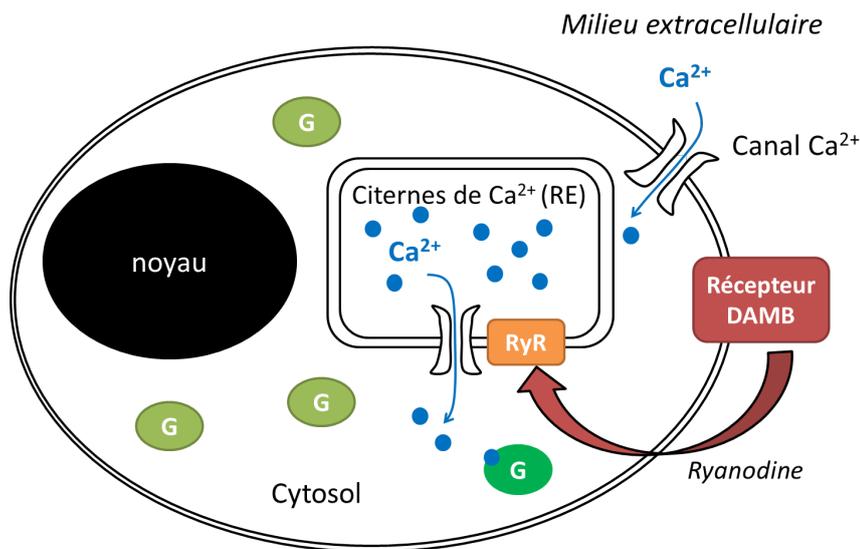


FIGURE 5.33 – Schématisation du lien entre les récepteurs dopaminergiques DAMB et les réserves intracellulaires de calcium  $\text{Ca}^{2+}$ . RE : réticulum endoplasmique. RyR : récepteur à la ryanodine. G : sonde calcique G-CaMP6f.

Pour comprendre le rôle des réserves de calcium intracellulaire, une expérience pharmacologique, utilisant la thapsigargine, a été menée (figure 5.19). Cette molécule a pour but d’empêcher le repompage du calcium par les pompes SERCA dans les réserves intracellulaires comme le réticulum endoplasmique. Nous avons alors expliqué la désensibilisation observée avec la sonde calcique par l’épuisement des réserves internes de calcium. Ainsi, lors des stimulations répétées, l’information de la stimulation passe par le récepteur dopaminergique DAMB. Celui-ci est couplé aux citernes de calcium intracellulaire grâce aux récepteurs à la ryanodine. La répétition des stimulations va conduire à l’épuisement progressif de ces réserves internes de calcium. Une schématisation du lien entre les récepteurs dopaminergiques DAMB et les réserves intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  est présentée à la figure 5.33. La sonde calcique G-CaMP6f est exprimée dans le cytoplasme des neurones. Sa variation de fluorescence est donc sensible à l’entrée de calcium depuis le milieu extracellulaire mais également au relargage de calcium des réserves vers le cytoplasme. Seule l’entrée de calcium depuis le milieu extracellulaire correspond à la transmission neuronale d’informations. Ainsi, la sonde calcique n’est pas spécifique de l’activité neuronale mais inclut aussi le phénomène d’épuisement des réserves de calcium. Etant donné que la sonde voltage, rendant compte directement de l’activité électrique des neurones, montre

## Chapitre 5. Électrophysiologie optique alliant imagerie HiLo haute cadence et biosenseurs fluorescents ultra-rapides

---

une augmentation de la réponse lors de stimulations répétées (figure 5.18), la désensibilisation observée avec la sonde calcique correspond bien à l'épuisement des réserves internes de calcium.

### 5.5.3 Sonde voltage ArcLight et analyse moléculaire

L'utilisation de la sonde voltage ArcLight, dans notre étude des réponses à des stimulations répétées, a révélé une sensibilisation des neurones du lobe  $\alpha$  (figure 5.18). L'excitation des neurones, chez les vertébrés comme chez les invertébrés, est grandement régulée par l'action de neurotransmetteurs inhibiteurs comme le GABA. À la différence des sondes calciques, la sonde ArcLight permet aussi de s'intéresser aux mécanismes d'inhibition des neurones par sa capacité à traduire l'hyperpolarisation des neurones en signaux de fluorescence. Dans l'activité neuronale, l'inhibition qui est typiquement relayée par les ions chlorure  $\text{Cl}^-$ , représente une facette aussi importante que l'excitation. Des sondes fluorescentes génétiquement encodées sensibles aux ions chlorure intracellulaires ont par ailleurs été développées [244, 245]. La sonde voltage permet à elle seule d'étudier l'excitation et l'inhibition des neurones à haute vitesse et ne nécessite donc pas l'encodage d'une sonde calcique pour le suivi de l'excitation et d'une sonde sensible aux ions chlorure pour le suivi de l'inhibition. Une surexpression des récepteurs GABAergiques a montré une augmentation de la composante d'hyperpolarisation de la réponse aux stimulations électriques (figure 5.20). Pour pouvoir attribuer de façon certaine, cette composante à une inhibition GABAergique, il pourrait également être intéressant d'étudier l'effet du blocage des récepteurs RDL. Le blocage des récepteurs  $\text{GABA}_A$  peut se faire soit par pharmacologie en appliquant sur le cerveau de la bicuculline ou de la gabazine, soit par génétique en exprimant un ARN interférant contre ces récepteurs. Lors de l'excitation des neurones, il semblerait qu'un circuit d'inhibition soit activé afin de contenir l'excitation. Au fur et à mesure des stimulations, la composante d'hyperpolarisation diminue (figure 5.18A) conduisant alors à l'augmentation de la réponse excitatrice et à ce qu'on peut appeler un phénomène de sensibilisation.

### 5.5.4 Cartographie spatiale *in vivo* de la réponse aux chocs électriques

Afin d'étudier plus finement le mécanisme de sensibilisation des neurones, observé avec la sonde voltage ArcLight, nous avons réalisé des cartographies de réponses aux chocs électriques. Ces cartographies ont pour but de se rapprocher, grâce à la capacité de sectionnement optique de la microscopie HiLo, de l'imagerie d'un réseau de neurones à l'échelle du neurone individuel. L'imagerie a été réalisée au niveau du lobe vertical  $\alpha$  des corps pédonculés. Il s'agit d'un bon modèle pour analyser des motifs d'activité d'une population de neurones. En effet, un grand nombre d'axones, environ 1000, peuvent être imagés simultanément en coupe transverse au niveau d'un seul plan focal. Ce n'est pas le cas si cette étude est réalisée au niveau des corps cellulaires de ces neurones de type  $\alpha/\beta$ , comme il est montré au Chapitre 4, où il faut pouvoir imager en temps réel l'ensemble des corps cellulaires répartis en trois dimensions. Cette approche, d'imagerie tridimensionnelle massive de l'ensemble des corps cellulaires des neurones des corps pédonculés, n'est pas adaptée à notre étude où nous avons choisi des stimulations électriques extrêmement courtes et où le rapporteur d'activité neuronale est une sonde voltage

rapide. Les cartographies du lobe  $\alpha$  ont permis de retrouver le phénomène de sensibilisation qui avait été observé en intégrant spatialement tous les neurones mais en y apportant une explication causale. Nos résultats préliminaires sont plutôt en faveur d’une diminution du nombre de neurones inhibés au fil des stimulations, témoin d’une diminution de la rétroaction GABAergique. Les cartographies spatiales montrent également une répartition spatiale inhomogène des neurones excités : tous les neurones ne répondent pas à la stimulation. La littérature regorge d’exemples de réponses aux odeurs encodées de façon éparsée et non exhaustive, du fait de l’inhibition GABAergique, au niveau des corps cellulaires [51, 184, 197] ou du lobe  $\alpha$  [246]. Cette dernière étude [246] a été menée avec un microscope biphotonique à balayage à une fréquence d’acquisition de 15 Hz et en utilisant une sonde calcique fluorescente de la famille des G-CaMP (la sonde G-CaMP7) et n’atteint donc pas la résolution temporelle de notre étude, où l’imagerie optique est réalisée à 100 Hz. Les auteurs démontrent que les populations de neurones, répondant à deux odeurs différentes, octan-3-ol et 4-méthylcyclohexanol, sont différentes. La sonde calcique ne leur permet néanmoins pas de s’intéresser séparément aux neurones excités et aux neurones inhibés. Notre approche permet de discerner spatialement les neurones excités et les neurones inhibés lors d’une stimulation. Nos résultats sont encore trop préliminaires pour tirer des conclusions en termes de sous-populations de neurones excités et inhibés au sein du lobe  $\alpha$ . Néanmoins, l’apport de la sonde voltage ArcLight pour le suivi optique de l’activité neuronale est incontestable. Il pourrait être intéressant par exemple de comparer les cartes d’activation et d’inhibition cérébrale pour deux stimuli ayant des valeurs différentes, positive dans le cas de l’apport de sucre et négative dans le cas où des chocs électriques sont délivrés à la drosophile.

### 5.5.5 Microscopie optique et électrophysiologie *in vivo*

Les études électrophysiologiques classiques chez la drosophile ne sont pas aisées du fait de la très petite taille de sa tête. Néanmoins, la technique de patch-clamp [247], qui permet des études électrophysiologiques, a pu être adaptée à la drosophile [26, 248], et a même permis d’explorer le fonctionnement des corps cellulaires des corps pédonculés [249]. Toutefois, ces techniques de mesure de l’activité cérébrale, par implantation d’électrodes dans le cerveau, sont assez invasives et ne permettent pas un accès facile à toutes les parties du cerveau. Notamment, chez les insectes, une grande partie de l’information est localisée dans les arborisations des neurones, axones et dendrites, loin des corps cellulaires, et sont difficiles à cibler avec des enregistrements électrophysiologiques. Un enregistrement au niveau des corps cellulaires ne représente qu’imparfaitement le comportement électrique du reste du neurone [250]. L’électrophysiologie classique a l’avantage d’une grande résolution temporelle, mais elle ne permet l’étude simultanée que d’un nombre très limité de neurones.

Pour étudier des populations entières de neurones bien ciblés, l’optique est alors plus adaptée. Néanmoins, il a fallu pour cela des années de développement des sondes fluorescentes encodées génétiquement de manière à ce qu’elles soient assez sensibles pour rapporter fidèlement l’activité électrique des neurones, et exprimables dans les neurones d’intérêt. Des études combinant des mesures électrophysiologiques classiques à de la microscopie optique [83] ont montré que certaines sondes calciques, comme la G-CaMP 1.3 peuvent ne pas être assez sensibles pour retranscrire l’activité neuronale [45, 48], pouvant conduire à de mauvaises interpré-

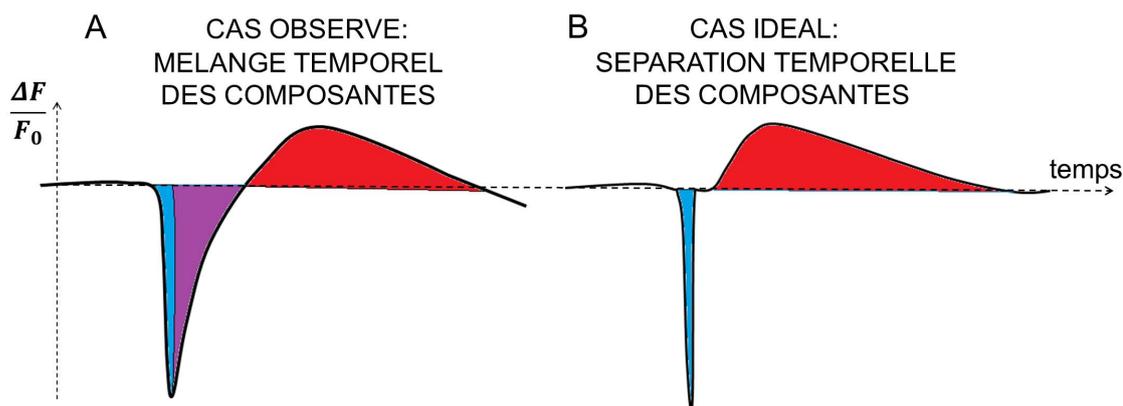


FIGURE 5.34 – Schématisation de la réponse en fluorescence obtenue avec une sonde fluorescente de type voltage. (A) Cas expérimental pour la sonde voltage ArcLight. (B) Cas idéal. Les couleurs bleu, rouge et violet correspondent respectivement à l’excitation, à l’inhibition et au mélange excitation-inhibition.

tations des résultats, notamment concernant le caractère épars du codage de l’information. Les sondes calciques, bien que n’affectant pas les propriétés électrophysiologiques des cellules [235], ont tendance à tamponner le calcium, pouvant conduire à une modification de la dynamique spatio-temporelle des ions  $\text{Ca}^{2+}$  [35] et de l’activité neuronale si par exemple la vague calcique est bloquée au niveau des dendrites et ne peut alors pas atteindre les corps cellulaires. Pour suivre l’activité neuronale des drosophiles en réponse à des stimuli, j’ai majoritairement utilisé la sonde voltage ArcLight, sonde récemment développée, rapide et sensible.

Toutefois, pour le suivi rapide de l’activité neuronale, la rapidité de la sonde fluorescente ne suffit pas. Il faut également utiliser un microscope rapide et bien résolu spatialement. Une absence de capacité de sectionnement optique du microscope couplé à l’utilisation de la sonde voltage, peut conduire à de graves erreurs d’interprétation de l’activité des neurones [10]. En effet, un microscope plein champ intègre le signal provenant des plans qui ne sont pas au point et la contribution en fluorescence de ces plans peut ne pas être négligeable devant celle provenant du plan focal. La microscopie à illumination structurée, par exemple de type HiLo que j’ai mise en œuvre ici, permet de s’affranchir d’une grande partie de la fluorescence provenant des plans défocalisés. Ainsi, il n’est pas nécessaire d’utiliser des pilotes d’expression des sondes fluorescentes plus restreints, et un grand nombre de neurones, 1000 pour les neurones de type  $\alpha/\beta$ , peuvent être étudiés en parallèle. L’optique, couplée à des sondes rapides de type voltage ArcLight, permet donc de dépasser les performances de l’électrophysiologie classique en termes de population de neurones étudiée. Néanmoins, une limitation persiste, celle du temps de réponse de la sonde ArcLight. Bien que très optimisée, la résolution temporelle n’atteint pas la milliseconde comme il est couramment atteint en électrophysiologie classique. Cette limitation de vitesse s’illustre parfaitement dans les cartographies spatiales de réponse à des stimulations électriques au niveau du lobe  $\alpha$  des corps pédonculés. Dans cette étude, la rapidité de la sonde voltage ArcLight ne permet pas de séparer clairement temporellement les phases successives d’excitation et d’inhibition. En effet, lorsque le processus d’inhibition débute, la fluorescence de la sonde voltage ArcLight n’est pas revenue à son niveau basal (figure 5.31). Le signal optique

mesuré mélange alors à la fois les contributions excitatrices et inhibitrices (figure 5.34A) alors que la situation idéale pour l'étude de l'activité neuronale consisterait à pouvoir les observer de manière indépendante (figure 5.34B). Il faudrait alors être en mesure de découpler, dans le signal optique de fluorescence de la sonde voltage ArcLight, les deux contributions par modélisation des deux phases. Le défaut de rapidité de la sonde voltage ArcLight est également visible dans les études moléculaires qui ont été menées sur les récepteurs : dopaminergiques DAMB et GABAergiques GABA<sub>A</sub>. Dans ces deux cas, une modification de la composante excitatrice entraîne une modification de la composante inhibitrice et vice versa (figures 5.20 et 5.22).

## 5.6 Conclusion

Dans cette étude, j'ai utilisé la sonde calcique G-CaMP6f, dont le temps de réponse et la sensibilité ont été grandement optimisés. Elle m'a permis de suivre la réponse à un stimulus dans un animal adulte *in vivo*. Cette sonde a permis de mettre en évidence le mécanisme de désensibilisation des citernes intracellulaires de calcium suite à des stimulations répétées. La sonde voltage ArcLight, sensible à la fois aux processus d'excitation et d'inhibition, a permis de mener des études à l'échelle moléculaire du circuit de transmission de l'information de la stimulation électrique vers les corps pédonculés de la drosophile. La transmission de l'excitation est médiée par les récepteurs dopaminergiques DAMB, couplés aux réserves de calcium intracellulaire. L'inhibition des neurones semble être de type GABAergique mais la limitation temporelle de la sonde ArcLight ne permet pas d'en préciser le mécanisme. La combinaison avec un dispositif de microscopie rapide et capable de sectionnement optique a permis de cartographier l'activité neuronale au niveau du lobe  $\alpha$ , faisceau d'axones des corps pédonculés. Ces cartographies ont révélé la présence de populations de neurones médiant l'excitation et/ou l'inhibition ainsi que la diminution des neurones inhibés suite à des stimulations répétées.

# Conclusion et perspectives

## Conclusion générale

Cette thèse avait pour objectif principal d'identifier plus précisément la population de neurones impliqués dans les mécanismes mnésiques chez la drosophile, en utilisant des techniques de microscopie de fluorescence. L'apport de l'optique est considérable pour les études en neurobiologie car elle permet une approche multi-échelle en observant *in vivo* les neurones possiblement actifs au sein de leur réseau natif (comme représenté sur la figure 5.35).

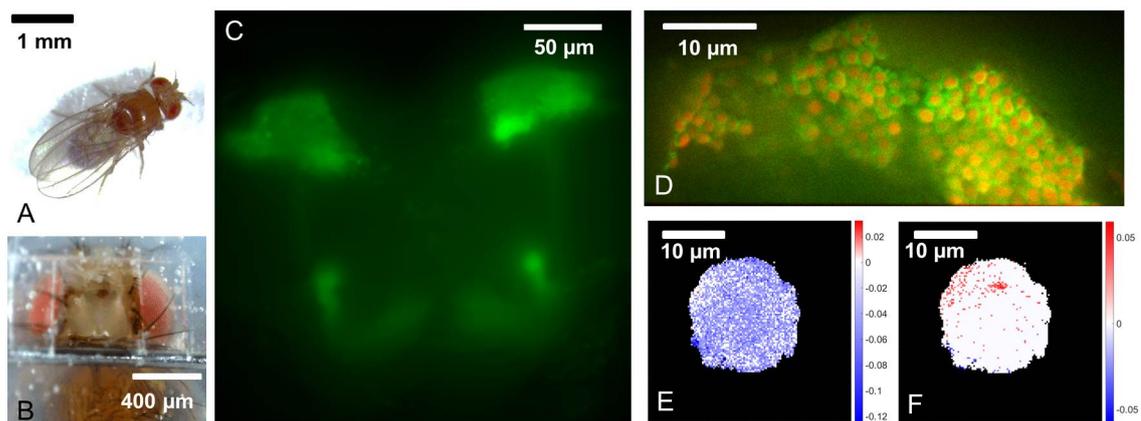


FIGURE 5.35 – De l'organisme entier à l'échelle du neurone individuel. (A) Photographie d'une drosophile adulte. (B) Photographie de la tête d'une drosophile préparée pour l'imagerie optique *in vivo*. (C) Image de fluorescence du réseau neuronal des corps pédonculés marqués avec la protéine fluorescente verte GFP. (D) Image de fluorescence des corps cellulaires des neurones des corps pédonculés obtenue avec un microscope multiconfocal de type "spinning disk". Un double marquage est utilisé : rouge (mCherryNLS) pour le marquage des noyaux et vert (ici ArcLight) pour le suivi de l'activité neuronale par voie optique. (E) et (F) Sections optiques HiLo au niveau de la branche axonale  $\alpha$  des corps pédonculés. Ces images présentent les cartographies de l'activité neuronale (en termes de variation de fluorescence  $\Delta F/F_0$ ), pendant la phase d'excitation en bleu (E) et pendant l'inhibition en rouge (F), en réponse à une stimulation punitive de type micro-chocs électriques, cartographies obtenues avec la sonde voltage ArcLight.

Les microscopies conventionnellement utilisées dans le domaine de la neurobiologie de la drosophile sont les microscopies confocale et biphotonique. Ces techniques d'imagerie ne sont plus limitées, comme à leur début, par une faible cadence d'acquisition des images, et

ce grâce à de nouvelles méthodes de balayage rapide. Elles restent néanmoins des techniques point à point qui nécessitent alors l'utilisation de puissances d'excitation lumineuse non négligeables, pouvant se révéler néfastes dans le cadre de l'imagerie du vivant. Pour notre étude des réseaux neuronaux impliqués dans la mémorisation chez la drosophile, nous avons préféré faire appel à deux types de microscopies originales dans le domaine : la microscopie à illumination structurée de type HiLo et la microscopie multicon focale de type "spinning disk".

Les caractéristiques essentielles du système de microscopie pour l'imagerie tridimensionnelle des réseaux neuronaux de la drosophile en activité sont : une capacité de sectionnement optique, une exposition au laser d'excitation modérée et une rapidité d'acquisition des images. Pour satisfaire à ces conditions, j'ai mis en œuvre une technique de microscopie de fluorescence basée sur l'utilisation d'une illumination structurée. L'approche choisie a été la **microscopie de type HiLo**, développée en premier lieu par J. Mertz, qui permet de s'affranchir des photons provenant des plans hors mise au point. La reconstruction des sections optiques HiLo nécessite très peu de modifications par rapport à un microscope plein champ traditionnel : la principale adaptation est l'incorporation d'un élément optique permettant de façonner le faisceau d'excitation. Le sectionnement est assuré par la modulation de l'illumination qui agit en tant que porteuse optique pour les composantes de basse fréquence spatiale provenant uniquement du plan de focalisation. Pour disposer d'une cadence d'acquisition élevée, mais également pour avoir plus de flexibilité (dans le choix des motifs imprimés), nous avons tiré profit des progrès en matière de microsystèmes électromécaniques et avons utilisé une matrice de micro-miroirs pour "imprimer" un motif de grille d'intensité sur le faisceau d'excitation. Les avantages liés à l'utilisation de la matrice de micro-miroirs sont nombreux. Seules quelques microsecondes sont nécessaires pour alterner d'un motif d'illumination à l'autre. Ce point est très important car la microscopie HiLo nécessite la prise de deux images de la même scène avec deux illuminations différentes : une illumination uniforme et une illumination structurée. De plus, les motifs projetés par la matrice de micro-miroirs sur l'échantillon peuvent être personnalisés très facilement pour adapter par exemple la fréquence spatiale de la modulation pour l'imagerie en profondeur dans les tissus, ou l'étendue de la zone exposée au laser d'excitation. La microscopie HiLo tire son efficacité du contraste de la grille dans l'échantillon. En surface du cerveau de la drosophile et jusqu'à quelques dizaines de microns de profondeur (environ 20 microns), cette microscopie permet d'obtenir des coupes optiques d'épaisseur environ égale à  $2 \mu\text{m}$  avec des cadences d'acquisition importantes. Typiquement, j'ai pu imager un des faisceaux d'axones des corps pédonculés à une fréquence de 100 Hz, ce qui correspond à un temps d'exposition de 5 ms pour chacune des images enregistrées en illumination uniforme et en illumination structurée. Aux puissances d'excitation laser utilisées, aucun phénomène de photoblanchiment limitant n'a été observé pour des durées d'imagerie globale relativement grandes allant jusqu'à une dizaine de minutes pour certaines expériences d'imagerie fonctionnelle.

La capacité de sectionnement optique de la microscopie HiLo en surface a été mise à profit pour réaliser des **cartographies de l'activité neuronale** de la drosophile en réponse à une stimulation punitive de type micro-chocs électriques. Ces études ont été réalisées en

suivant l'évolution du niveau de la fluorescence émise par des rapporteurs d'activité, au niveau d'une des branches axonales des neurones des corps pédonculés. Nous avons utilisé comme rapporteurs d'activité des sondes fluorescentes encodées génétiquement qui ont connu ces dernières années de nombreux développements. La principale évolution dans le domaine des sondes fluorescentes est leur capacité à permettre le suivi de l'activité neuronale "en temps réel". Plus spécifiquement, j'ai utilisé au cours de ma thèse deux types de sondes fluorescentes encodées génétiquement qui permettent de réaliser une imagerie fonctionnelle des réseaux neuronaux. Une **sonde calcique** de dernière génération, la sonde G-CaMP6f, a été utilisée pour suivre la concentration intracellulaire en calcium. Les sondes calciques sont les rapporteurs d'activité les plus couramment employés dans ce domaine pour suivre l'activité neuronale *in vivo*, car il existe un lien entre potentiel d'action et concentration calcique cytosolique. Néanmoins, le suivi de la concentration intracellulaire en ions calcium avec une sonde fluorescente n'est qu'une mesure indirecte de l'activité neuronale. Pour accéder à une mesure directe, j'ai également utilisé une sonde encodée génétiquement sensible au potentiel membranaire des neurones, la **sonde voltage** ArcLight. Les variations de sa fluorescence donnent accès à la différence de potentiel à travers la membrane des neurones qui l'expriment : il peut s'agir d'une dépolarisation, témoin d'une excitation neuronale ou au contraire d'une hyperpolarisation reflétant un phénomène d'inhibition. Cette sonde fluorescente permet de réaliser des mesures d'activité électrique proches de celles de l'électrophysiologie de manière moins invasive (car optique) par encodage génétique : il n'est pas nécessaire de percer la membrane des neurones avec une électrode pour étudier leur potentiel membranaire.

En combinant ces sondes fluorescentes, calciques ou de type voltage, avec les puissants outils génétiques développés chez l'organisme modèle qu'est la drosophile, il est alors possible de réaliser des études fonctionnelles cérébrales *in vivo*. Les résultats de ces expérimentations concernent notamment la différence de signalisation optique entre les sondes calciques et voltage, tant du point de vue de leur cinétique que de l'origine de leur variation de fluorescence. La sonde voltage ArcLight est beaucoup plus rapide que la sonde calcique G-CaMP6f, que ce soit pour suivre l'excitation neuronale ou le retour à l'état basal. De plus, alors qu'une apparente sensibilisation en réponse à des chocs répétés est observée en utilisant la sonde ArcLight comme rapporteur d'activité, la sonde calcique G-CaMP6f révèle une désensibilisation des neurones de type  $\alpha/\beta$  des corps pédonculés. Cette différence *a priori* contradictoire a été expliquée par le fait que la variation de fluorescence des sondes calciques n'est pas uniquement sensible à l'entrée d'ions calcium dans le cytoplasme des neurones suite à un potentiel d'action. Elle dépend également d'autres apports de calcium dans le cytoplasme comme le relargage d'ions calcium par les réserves intracellulaires situées dans le réticulum endoplasmique. Ces réserves s'épuisent au fil des stimulations répétées, entraînant la diminution de la réponse en fluorescence mesurée avec la sonde calcique G-CaMP6f. Cette décroissance n'est pas observée en utilisant la sonde voltage car celle-ci reflète l'activité électrique des neurones et non une signalisation moléculaire secondaire intracellulaire. La sonde voltage ArcLight permet donc de suivre plus rapidement et plus fidèlement l'activité électrique des neurones que la sonde calcique. Elle tire également sa puissance de sa capacité à retranscrire non seulement l'excitation mais également l'inhibition neuronale.

Le rôle de différents récepteurs dans la transmission de l'information punitive jusqu'aux

corps pédonculés, tels que les récepteurs dopaminergiques DAMB et GABAergiques GABA<sub>A</sub>, a été étudié grâce à la sonde voltage. Ce sont des outils comme le système d'expression de transgène UAS/GAL4 ou l'interférence ARN qui ont permis de réaliser ces études à l'échelle de ces récepteurs, bien que la résolution spatiale du microscope optique ne permette pas de les distinguer. La microscopie HiLo couplée à la sonde voltage ArcLight a permis de réaliser des coupes optiques à une cadence d'acquisition de 100 Hz, au niveau du lobe  $\alpha$  des corps pédonculés où sont regroupés, en un faisceau d'environ 1000 axones, des neurones de type  $\alpha/\beta$ . Le but est d'étudier au sein d'une population de neurones les processus d'excitation et d'inhibition en réponse à des micro-chocs électriques. Les premiers résultats indiquent que les neurones de type  $\alpha/\beta$  répondent de façon non homogène à une stimulation. Ces résultats préliminaires mettent également en évidence une diminution de la fraction de neurones inhibés lors de stimulations répétées pouvant probablement expliquer le phénomène de sensibilisation observé.

Pour étudier la totalité des neurones des corps pédonculés nous avons cherché à imager leurs corps cellulaires. Ces derniers ont une taille typique de 1 à 2  $\mu\text{m}$  de sorte que la résolution spatiale des microscopes limités par la diffraction est suffisante pour les observer individuellement. Il s'agit d'un projet très ambitieux dont le but à long terme est de décoder exactement un événement de mémorisation à l'échelle du neurone individuel, tout en ayant l'information du réseau de neurones environnant. J'ai ainsi réalisé les expériences concernant ce projet sur un dispositif de microscopie multiconfocale de type “**spinning disk**” du laboratoire de neurobiologie à l'ESPCI. Le principe de ce microscope est la parallélisation du faisceau d'excitation dans le but d'augmenter la cadence d'acquisition, mais surtout de diminuer les puissances lumineuses en comparaison avec la microscopie confocale, pour obtenir un nombre de photons de fluorescence suffisant. L'approche génétique utilisée pour la détection informatique des corps cellulaires des neurones est l'utilisation de deux marquages fluorescents spectralement disjoints. Un marquage morphologique rouge a été utilisé pour repérer le noyau des corps cellulaires et le rapporteur d'activité émettant dans le vert a été encodé soit au niveau du cytoplasme par la sonde calcique G-CaMP6f, soit au niveau de la membrane par la sonde voltage ArcLight. Ce projet en est à l'étape de développement et n'a pas permis encore de répondre à des questions biologiques d'intérêt. Nous avons développé le dispositif de stimulation (olfactive et électrique) et l'avons couplé au microscope. Le programme de reconnaissance des noyaux des corps cellulaires mis au point par nos collaborateurs de l'ENS Paris (en particulier Felipe Delestro) est en cours d'optimisation.

Les deux approches pour l'étude d'une grande population de neurones, soit au niveau des axones soit au niveau des corps cellulaires, sont complémentaires. L'étude réalisée avec la microscopie HiLo, au niveau d'une coupe transverse des projections axonales, permet d'accéder dans un seul plan à la réponse de l'ensemble des neurones de type  $\alpha/\beta$  des corps pédonculés. Le fait de n'imager qu'un seul plan permet d'atteindre une très haute cadence temporelle nécessaire pour le suivi de l'activité neuronale rapportée par les variations de fluorescence de la sonde voltage ArcLight. Néanmoins, la résolution spatiale des microscopes limités par la diffraction, dont fait partie la microscopie HiLo, ne permet pas de distinguer les axones les uns des autres et les conclusions ne peuvent donc être établies qu'en termes de

population de neurones et non à l'échelle du neurone individuel. Au contraire, les études réalisées au niveau des corps cellulaires des neurones par microscopie multiconfocale, permettent le suivi de l'activité de l'ensemble des neurones des corps pédonculés (sans se restreindre aux neurones de type  $\alpha/\beta$  dont une des bifurcations axonales forme le lobe  $\alpha$ ) avec une capacité de les discerner spatialement. La résolution temporelle est néanmoins réduite par rapport à l'imagerie au niveau du faisceau d'axones, car il est nécessaire d'acquérir l'image du volume entier dans lequel sont répartis les corps cellulaires. Typiquement, la fluorescence de chaque neurone a été suivie à une cadence de 2 Hz.

Les études menées au cours de cette thèse l'ont été principalement à proximité de la surface du cerveau, notamment pour l'imagerie du lobe  $\alpha$  et pour les corps cellulaires des neurones les moins profonds. Cependant, lorsque l'on veut imager plus en profondeur dans le cerveau de la drosophile, les aberrations optiques et la diffusion limitent le contraste des images. Toutes les techniques de microscopie sont sensibles à ces aberrations bien que leurs effets ne soient pas équivalents pour tous les systèmes. La microscopie à illumination structurée est particulièrement sensible aux aberrations car celles-ci affectent à la fois la qualité du motif à l'excitation et à l'émission en fluorescence. Quand on veut imager en profondeur dans le cerveau de la drosophile, sans corriger les aberrations optiques, il est souvent indispensable de diminuer la fréquence spatiale du motif utilisé pour l'illumination structurée afin de rehausser son contraste. Toutefois, ce changement de motif se fait au détriment de l'épaisseur de la coupe optique qui augmente. C'est pour pallier cette limitation que nous avons incorporé, sur le dispositif de microscopie HiLo, une boucle d'**optique adaptative**. L'approche développée n'utilise pas de mesure de front d'onde d'un objet de référence dans l'échantillon, mais est basée sur le calcul d'un facteur de mérite à partir des images de fluorescence enregistrées. L'enjeu est alors de choisir correctement la définition mathématique de ce facteur de mérite dont l'optimisation va réellement agir sur la qualité des images corrigées. Nous avons tiré parti de la structuration de l'illumination que nous avons utilisé comme "étoile guide" dans le cerveau. L'optimisation a ensuite été réalisée séquentiellement pour les différents modes d'aberrations décomposés sur la base des polynômes de Zernike. L'ajout de la boucle d'optique adaptative sur le dispositif de microscopie HiLo a apporté du gain en termes de contraste du motif d'illumination, et donc de reconstruction des sections optiques, jusqu'à 50  $\mu\text{m}$  de profondeur.

## Perspectives

Nos études ont montré que l'approche optique est particulièrement adaptée au suivi de l'activité électrophysiologique d'une grande population de neurones simultanément. Le senseur ArcLight est l'une des premières sondes sensibles au potentiel membranaire, suffisamment optimisée pour une utilisation *in vivo*. Cependant, son temps de réponse est trop long pour permettre de discriminer les processus neuronaux d'excitation et d'inhibition qui se produisent en réponse à une stimulation. Afin de résoudre temporellement de manière plus précise la réponse du circuit neuronal, il faudra utiliser une sonde voltage plus rapide, telle que le senseur ASAP1 développé par deux équipes de l'Université de Stanford en 2014 ayant un temps de réponse de l'ordre de la milliseconde [241]. Pour bénéficier de la grande dynamique de ces nouvelles sondes,

il faut pouvoir échantillonner rapidement la réponse d'un ensemble de neurones. L'approche choisie d'imager un seul plan au niveau du faisceau d'axones des neurones se projetant dans le lobe  $\alpha$  est particulièrement adaptée, mais requiert cependant que nous améliorions la résolution spatiale afin de pouvoir résoudre les axones individuellement. L'approche de microscopie à illumination structurée de type HiLo qui a été mise en œuvre au cours de cette thèse est une technique d'imagerie limitée par la diffraction qui ne permet pas d'atteindre cette résolution spatiale. Il faut alors recourir à des techniques de microscopie de superrésolution. La microscopie à illumination structurée, telle que celle développée par M. Gustafsson où la même image est enregistrée avec différentes orientations de grille, est la technique de choix de super-résolution pour l'imagerie plein champ. Toutefois, comme la microscopie HiLo, cette technique d'illumination structurée est sensible aux aberrations optiques. Pour reconstruire des images superrésolues de qualité, le contraste de la grille de modulation doit être relativement élevé. Ainsi, même proche de la surface du cerveau de la drosophile, au niveau du faisceau d'axones du lobe  $\alpha$  par exemple, il sera probablement nécessaire de corriger les aberrations pour rétablir les performances de résolution optimale du système optique. Là encore, l'approche choisie pour corriger les aberrations optiques doit satisfaire aux contraintes temporelles. L'approche sans mesure de front d'onde avec correction séquentielle des aberrations (algorithme  $3N$  par exemple), qui est relativement lente, ne semble adaptée que si cette correction est effectuée avant l'expérience d'imagerie fonctionnelle et que les aberrations optiques se maintiennent au cours du temps, ce qui est en général le cas pour les aberrations de plus bas ordre. Si la correction des aberrations de plus bas ordre uniquement ne suffit pas pour rétablir un contraste suffisant pour la microscopie de superrésolution, plus de modes devront être corrigés. Pour ne pas introduire de retard entre la correction des aberrations et l'imagerie, une approche d'excitation biphotonique pourra alors être mise en œuvre pour corriger les aberrations en se basant sur une mesure directe du front d'onde provenant d'une "étoile guide" dans l'échantillon que pourrait constituer la focalisation d'un faisceau infrarouge sur les biosenseurs fluorescents exprimant la GFP.

Le développement conjoint de nouvelles modalités d'imagerie, en particulier la microscopie optique de superrésolution, et de rapporteurs de l'activité neuronale, devrait permettre de repousser nos connaissances en neurobiologie, même si le chemin est encore long pour comprendre tous les secrets du cerveau.

# A

## Expérience de conditionnement olfactif aversif pour étudier le rôle d'une cyclase dans la formation de la mémoire à court terme

### Sommaire

---

A.1 Introduction . . . . .	213
A.2 Matériel et méthodes . . . . .	214
A.3 Résultats . . . . .	214

---

### A.1 Introduction

Dans cette annexe est présentée une expérience de conditionnement associatif olfactif que j'ai réalisée en utilisant le protocole décrit dans la section 1.2.2 et les outils génétiques détaillés dans les sections 1.3.1.2 (interférence ARN) et 1.3.1.4 (système GAL80<sup>ts</sup>) du Chapitre 1. Le but de cette étude est de déterminer si l'adénylyl cyclase 76E est impliquée dans la mémorisation à court terme. Les adénylyl cyclase sont des enzymes qui catalysent notamment la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc permet à son tour d'activer la protéine kinase A (PKA). Cette cascade de signalisation, adénylyl cyclase, AMPc et PKA, est une des voies de signalisation les plus conservées dans le règne animal et est notamment présente chez l'homme. Celle-ci joue un rôle important dans la mémorisation chez la drosophile. Il a même été prouvé que l'adénylyl cyclase *rutabaga* joue le rôle de détecteur moléculaire de coïncidence capable d'intégrer, lors des conditionnements associatifs, des informations de deux origines différentes telles que le stimulus conditionnel

## Annexe A. Expérience de conditionnement olfactif aversif pour étudier le rôle d'une cyclase dans la formation de la mémoire à court terme

---

(odeur) et le stimulus inconditionnel (chocs électriques) [198]. L'adenylyl cyclase 76E que l'on se propose d'étudier est impliquée chez la drosophile dans des processus tels que la croissance [251] mais elle n'a pas été reliée au processus de mémorisation.

### A.2 Matériel et méthodes

Quatre lignées transgéniques de drosophiles ont été utilisées pour cette étude dont trois d'entre elles servent de contrôle à l'expérience :  $+/+$ ,  $tubulin-GAL80^{ts};238y-GAL4/+$  et  $UAS-AC76E^{GD51975}/+$ . Le symbole "+" correspond à un allèle non modifié, ainsi par exemple la lignée  $UAS-AC76E^{GD51975}/+$  est hétérozygote pour le gène considéré.  $tubulin-GAL80^{ts}-238y-GAL4/+$  correspond au pilote d'expression et  $UAS-AC76E^{GD51975}/+$  à l'ARNi contre l'adenylyl cyclase 76E. La lignée d'intérêt correspond au croisement des deux lignées précédentes et est notée  $tubulin-GAL80^{ts}-238y-GAL4;UAS-AC76E^{GD51975}$ . Cette lignée exprime donc l'ARNi contre l'adenylyl cyclase 76E dans tous les neurones des corps pédonculés (pilote d'expression  $238y-GAL4$ , voir tableau 1.2 du Chapitre 1) mais uniquement à haute température grâce au système  $GAL80^{ts}$ , dont le fonctionnement est explicité dans la section 1.3.1.4. Cet outil génétique permet ici de restreindre l'activité du  $GAL4$  à l'âge adulte afin de limiter les défauts de développement de l'animal dus à l'expression de l'ARNi pendant toutes les phases de développement. Ainsi, les drosophiles ont été élevées à basse température ce qui conduit la protéine  $GAL80^{ts}$  à se fixer sur la protéine  $GAL4$  empêchant l'expression de l'ARNi contre l'adenylyl cyclase 76E. Deux jours avant l'expérience, les drosophiles ont été placées à  $30.5^{\circ}\text{C}$  afin de neutraliser l'effet de la protéine  $GAL80^{ts}$ . L'expérience {conditionnement+test} a aussi été réalisée à haute température ( $30.5^{\circ}\text{C}$ ). Les deux odeurs utilisées pour le conditionnement associatif aversif sont les produits chimiques 4-méthylcyclohexanol et octan-3-ol. Ces mêmes odeurs seront employées pour les expériences présentées dans le Chapitre 4. Les  $n$  groupes d'une quarantaine de drosophiles ont été testées trois heures après le conditionnement.

### A.3 Résultats

Les résultats sont présentés sur la figure A.1. L'indice de performance vaut approximativement 0.5 pour tous les génotypes. Aucun défaut de mémoire n'est donc observé pour la lignée de drosophile  $tubulin-GAL80^{ts}-238y-GAL4;UAS-AC76E^{GD51975}$ . L'adenylyl cyclase 76E ne semble donc pas être impliquée dans la mémoire à court terme de type aversive chez la drosophile, ni dans l'apprentissage ni dans le rappel du souvenir. Néanmoins, il faut rester prudent avec ces résultats. Les cyclases étant des protéines stables, il faut s'assurer que la protéine  $GAL80^{ts}$  a bien agi en conduisant à la diminution de l'adenylyl cyclase 76E à la membrane des neurones.

## Annexe A. Expérience de conditionnement olfactif aversif pour étudier le rôle d'une cyclase dans la formation de la mémoire à court terme

---

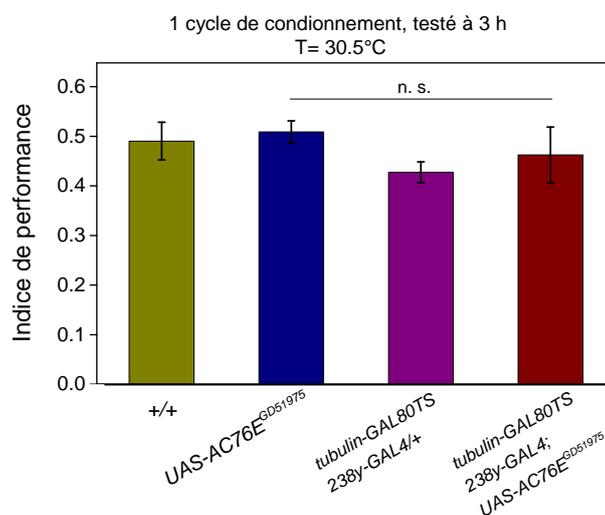


FIGURE A.1 – Indice de performance pour un protocole de mémoire associative aversive à court terme visant à déterminer le rôle de l'adenylyl cyclase 76E. La lignée testée est *tubulin-GAL80<sup>ts</sup>-238y-GAL4;UAS-AC76E<sup>GD51975</sup>* (en rouge,  $n = 10$ ). Les lignées suivantes servent de contrôle à l'expérience : *+/+* ( $n = 10$ ), *tubulin-GAL80<sup>ts</sup>;238y-GAL4/+* ( $n = 9$ ) et *UAS-AC76E<sup>GD51975</sup>/+* ( $n = 10$ ). Test statistique ANOVA :  $F(2, 26) = 1.148$  ;  $p = 0.330$ ,  $n = 9 - 10$ . n.s. : non significatif ( $p > 0.05$ ).



# B

## Filtre LoG : Laplacian of Gaussian

Le Laplacien est une mesure 2D de la dérivée seconde d'une image. Ce calcul met en valeur les régions de l'image présentant des variations de luminosité rapides. Le Laplacien est donc particulièrement adapté pour la détection des contours dans une image. D'un point de vue mathématique il s'exprime, en deux dimensions, sous la forme :

$$L(x, y) = \frac{\partial^2 I(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 I(x, y)}{\partial y^2}, \quad (\text{B.1})$$

où  $L(x, y)$  et  $I(x, y)$  dénotent respectivement le Laplacien et l'image exprimés en coordonnées cartésiennes 2D. L'opérateur  $\partial$  correspond à la dérivée partielle. En pratique, avant l'application du filtre Laplacien, on utilise une étape de pré-filtrage gaussien car le Laplacien est très sensible au bruit du fait de son caractère second ordre. Cette étape permet de "lisser" l'image et ainsi de réduire les composantes hautes fréquences qui introduisent du bruit lors des dérivations successives utilisées pour le calcul du Laplacien. La convolution étant commutative et associative :

$$\begin{aligned} F(x, y) &= L(x, y) * [I(x, y) * g(x, y)] \\ &= L(x, y) * [g(x, y) * I(x, y)] \\ &= [L(x, y) * g(x, y)] * I(x, y), \end{aligned} \quad (\text{B.2})$$

où  $F(x, y)$  correspond à l'image finale après l'application des filtres gaussien et laplacien,  $g(x, y)$  est la gaussienne qui permet le pré-filtrage de l'image initiale  $I(x, y)$ .  $*$  est le produit de convolution. La convolution  $L(x, y) * g(x, y)$  correspond au filtre LoG (pour Laplacian of Gaussian).

Pour une gaussienne 2D, de déviation standard  $\sigma$  ( $\sigma_x = \sigma_y = \sigma$ ) exprimée sous la forme :

$$g(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \times \exp -\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}. \quad (\text{B.3})$$

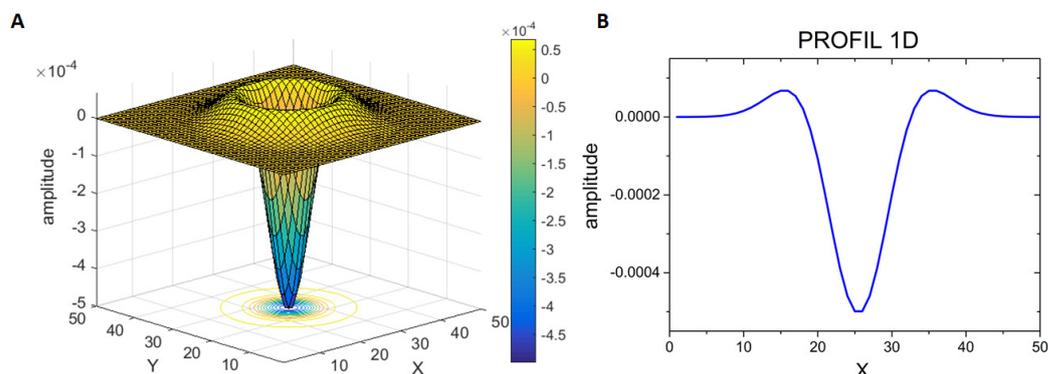


FIGURE B.1 – Filtre Laplacian of Gaussian. (A) Représentation en 2D. (B) Profil 1D. La valeur de  $\sigma$  utilisée pour le tracé est 5. Etant donné sa forme, ce filtre est surnommé “Mexican hat”.

On obtient après deux dérivations successives l’expression du filtre LoG (représenté sur la figure B.1, noté  $LoG(x, y)$ )

$$\begin{aligned}
 LoG(x, y) &= L(x, y) * g(x, y) & (B.4) \\
 &= \nabla^2(g(x, y)) \\
 &= \frac{\partial^2 g(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 g(x, y)}{\partial y^2} \\
 &= \frac{1}{\pi\sigma^4} \left( 1 - \frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2} \right) \times \exp -\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}.
 \end{aligned}$$

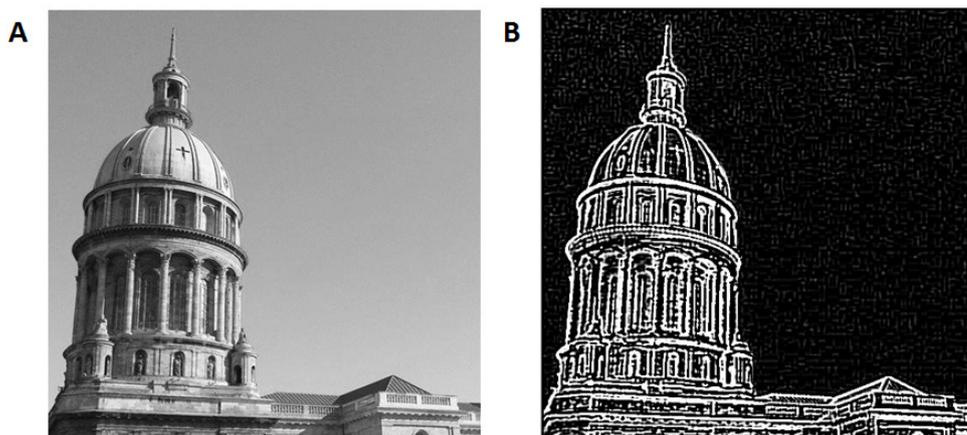


FIGURE B.2 – Exemple d’application du filtre LoG sur une image. (A) Image originale. (B) Image filtrée. Paramètres du filtre LoG : noyau  $7 \times 7$ ,  $\sigma = 2$ .

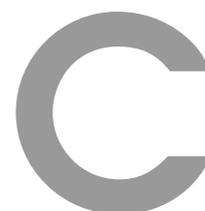
Un exemple d’application du filtre LoG sur une image est donné à la figure B.2. Les variations rapides d’intensité de l’image y sont mises en évidence. Ce filtre permet de faire ressortir

## Annexe B. Filtre LoG : Laplacian of Gaussian

---

les bords. Il est important de noter que le filtre LoG peut également être appliqué à la détection de formes de taille précise en rentrant la taille de la forme à détecter comme valeur du paramètre  $\sigma$  du filtre. C'est notre cas pour le projet d'imagerie exhaustive des corps pédonculés puisqu'il s'agit de détecter les noyaux sphériques des corps cellulaires marqués à la mCherry de taille bien précise ( $1.5 \mu\text{m}$ ). Tous les calculs présentés ici ont été réalisés en 2D. Néanmoins, l'expression du filtre LoG peut aussi être calculé en 3D.





Article 1 : Micromirror structured illumination  
microscope for high-speed *in vivo* drosophila  
brain imaging

# Micromirror structured illumination microscope for high-speed in vivo drosophila brain imaging

A. Masson,<sup>1</sup> M. Pedrazzani,<sup>1</sup> S. Benrezzak,<sup>1</sup> P. Tchenio,<sup>1,2,\*</sup> T. Preat,<sup>2</sup> and D. Nutarelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Aimé Cotton, CNRS, Université Paris-Sud 11, ENS Cachan, Bât 505, Campus d'Orsay, 91405 Orsay, France

<sup>2</sup>Gènes et Dynamiques des Systèmes de Mémoire, Unité de neurobiologie, CNRS, ESPCI, 10 Rue Vauquelin, 75005 Paris, France

\*[paul.tchenio@u-psud.fr](mailto:paul.tchenio@u-psud.fr)

**Abstract:** Genetic tools and especially genetically encoded fluorescent reporters have given a special place to optical microscopy in drosophila neurobiology research. In order to monitor neural networks activity, high speed and sensitive techniques, with high spatial resolution are required. Structured illumination microscopies are wide-field approaches with optical sectioning ability. Despite the large progress made with the introduction of the HiLo principle, they did not meet the criteria of speed and/or spatial resolution for drosophila brain imaging. We report on a new implementation that took advantage of micromirror matrix technology to structure the illumination. Thus, we showed that the developed instrument exhibits a spatial resolution close to that of confocal microscopy but it can record physiological responses with a speed improved by more than an order a magnitude.

© 2014 Optical Society of America

**OCIS codes:** (170.2655) Functional monitoring and imaging; (170.6900) Three-dimensional microscopy.

---

## References and links

1. A. H. Brand and N. Perrimon, "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes," *Development* **118**, 401–415 (1993).
2. B. D. Pfeiffer, T. T. Ngo, K. L. Hibbard, C. Murphy, A. Jenett, J. W. Truman, and G. M. Rubin, "Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*," *Genetics* **186** (2), 735–755 (2010).
3. K. J. Venken and H. J. Bellen, "Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*," *Genetics* **134** (20), 3571–3584 (2007).
4. G. Miesenbock, D. A. De Angelis, and J. E. Rothman, "Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins," *Nature* **394** (6689), 192–195 (1998).
5. A. Fiala, T. Spall, S. Diegelmann, B. Eisermann, S. Sachse, J. M. Devaud, E. Buchner, and C. G. Galizia, "Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons," *Current Biology* **12** (21), 1877–1884 (2002).
6. Y. Wang, H. F. Guo, T. A. Pologruto, F. Hannan, I. Hakker, K. Svoboda, and Y. Zhong, "Stereotyped odor-evoked activity in the mushroom body of *Drosophila* revealed by green fluorescent protein-based Ca<sup>2+</sup> imaging," *J Neurosci* **24** (29), 6507–6514 (2004).
7. S. M. Tomchik and R. L. Davis, "Dynamics of learning-related cAMP signaling and stimulus integration in the *Drosophila* olfactory pathway," *Neuron* **64** (4), 510–521 (2009).
8. N. Gervasi, P. Tchenio, and T. Preat, "PKA dynamics in a *Drosophila* learning center: coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase," *Neuron* **65** (4), 516–529 (2010).
9. T. J. Ebner and G. Chen, "Use of voltage-sensitive dyes and optical recordings in the central nervous system," *Prog Neurobiol* **46** (5), 463–506 (1995).

10. R. H. Webb, "Confocal optical microscopy," *Rep. Prog. Phys.* **59**, 427–471 (1996).
11. W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy," *Science* **248** (4951), 73–76 (1990).
12. A. Bullen, S. S. Patel, and P. Saggau, "High-speed, random-access fluorescence microscopy: High-resolution optical recording with voltage-sensitive dyes and ion indicators," *Biophys J.* **73** (1), 477–491 (1997).
13. G. Q. Xiao and G.S. Kino, "A real-time confocal scanning optical microscope," *Proc. SPIE* **0809**, 107–113 (1987).
14. J. Bewersdorf, R. Pick, and S. W. Hell, "Multifocal multiphoton microscopy," *Optics Letters* **23** (9), 655–657 (1998).
15. T. Nielsen, M. Fricke, D. Hellweg, and P. Andresen, "High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy," *J Microsc.* **201** (3), 368–376 (2001).
16. V. Nikolenko, B. O. Watson, R. Araya, A. Woodruff, D. S. Peterka, and R. Yuste, "SLM microscopy: scanless two-photon imaging and photostimulation with spatial light modulators," *Front. Neural Circuits* **2** (5), 1–14 (2008).
17. A. Nakano, "Spinning-disk confocal microscopy a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic," *Cell Struct Funct.* **27** (5), 349–355 (2002).
18. J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer, "Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy," *Science* **305** (5686), 1007–1009 (2004).
19. M. A. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson, "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope," *Opt. Express* **22** (24) 1905–1907 (1997).
20. L. H. Schaeffer, D. Schuster, and J. Schaffer, "Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach," *J Microsc.* **216** (2), 165–174 (2004).
21. D. Lim, K. K. Chu, and J. Mertz, "Wide-field fluorescence sectioning with hybrid speckle and uniform-illumination microscopy," *Opt. Express* **33** (16), 1819–1821 (2008).
22. J. Mertz and J. Kim, "Scanning light-sheet microscopy in the whole mouse brain with HiLo background rejection," *J Biomed Opt.* **15** (1), 016027 (2010).
23. S. Santos, K. K. Chu, D. Lim, N. Bozinovic, T. N. Ford, C. Hourtoule, A. C. Bartoo, S. K. Singh, and J. Mertz, "Optically Sectioned Fluorescence Endomicroscopy with Hybrid-Illumination Imaging through a Flexible Fiber Bundle," *Advances in Imaging* **14** (3), 30502 (2009).
24. T. N. Ford, D. Lim, and J. Mertz, "Fast optically sectioned fluorescence HiLo endomicroscopy," *J Biomed Opt.* **13** (2), 021105 (2012).
25. B. Zang, J. Zerubia, and J. C. Olivo-Marin, "Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models," *Applied Optics* **46** (10), 1819–1829 (2007).
26. J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (Plenum, 2006).
27. J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, 3rd ed. (Roberts, 2005).
28. A. Stocketh, "Properties of a Defocused Optical System," *JOSA* **59** (10), 1314–1321 (1969).
29. M. Heisenberg, "Mushroom body memoir: from maps to models," *Nat Rev Neurosci.* **4** (4), 266–275 (2003).
30. M. Heisenberg, A. Borst, S. Wagner, and D. Byers, "Drosophila mushroom body mutants are deficient in olfactory learning," *J Neurogenet.* **13**, 1–30 (1985).
31. J. B. Duffy, "GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife," *Genesis* **34** (1-2), 516–529 (2002).
32. R. I. Wilson, G. C. Turner, and G. Laurent, "Transformation of Olfactory Representations in the Drosophila Antennal Lobe," *Science* **303** (5656), 366–370 (2004).
33. L. Tian, S. A. Hires, T. Mao, D. Huber, M. E. Chiappe, S. H. Chalasani, L. Petreanu, J. Akerboom, S. A. Kinney, E. R. Schreier, C. I. Bargmann, V. Jayaraman, K. Svoboda, and L. L. Looger, "Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators," *Nature Methods* **6** (12), 875–881 (2009).
34. D. Yu, D. B. G. Akalal, and R. L. Davis, "Drosophila alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning," *Neuron* **52** (5), 845–855 (2006).
35. F. Christiansen, C. Zube, T. F. M. Andlauer, C. Wichmann, W. Fouquet, D. Oswald, S. Mertel, F. Leiss, G. Tavoanis, A. J. F. Luna, A. Fiala, and S. Sigrist, "Presynapses in Kenyon Cell Dendrites in the Mushroom Body Calyx of Drosophila," *J. Neurosci.* **31** (26), 9696–9707 (2011).

## 1. Introduction

Recent developments of fluorescent proteic sensors and optogenetic tools have given a particular place to optical microscopy for in vivo investigation of biological molecular processes. Owing to powerful genetic tools [1, 2] and easy transgenesis [3], drosophila neurobiology has taken full advantages of these developments [4–8]. In this field, current optical implementations rely on commercial optical set-up, usually either conventional wide-field epifluorescence, confocal or two-photon microscopes. Integrated analysis of most brain functions, like olfaction or memory for instance, would benefit from a global 3D monitoring of activity of the neurons

involved in the function. This is out of reach of current approaches. Wide-field epifluorescence microscopy provides a high speed imaging [9] but good spatial resolution is obtained only for thin samples. The drosophila brain contains about  $10^5$  neurons and its dimensions are about  $1\text{ mm} \times 0.3\text{ mm} \times 0.2\text{ mm}$ . In the context of drosophila brain studies, as for other thick samples, the lack of optical sectioning capability makes quantification difficult and the spatial resolution of images is poor. On the other hand, confocal or two-photon microscopy can realize high resolution optical sections but they scan sequentially each pixel. Even if high speed scanners have been developed [10, 11], the limited brightness of the biological samples sets a minimum pixel dwelling time and it makes the approach slow. Random-access imaging [12], which takes advantage of acousto-optical deflector technology to "jump" sequentially through a limited set of points of interest overcomes the speed limitation, but for living animal imaging, residual movements are a serious issue. In fact, speed requires to increase the parallelism of pixel acquisition. An intermediate trade-off is multifocal point scanning [13]. While also developed for two-photon microscopes [14–16], the fastest and the most mature technology is spinning-disk confocal microscopy implemented with a microlenses array [17]. This technique is convenient for a wide range of applications but it has two drawbacks for our *in vivo* imaging in neuro-imaging. First, it lacks flexibility. Pinholes size cannot be changed and either the microscope works at the optimal spatial resolution (usual solution in commercial versions) and the sensitivity is poor as soon as we go deeper in the tissue (typical diffusion length in the brain is around  $50\ \mu\text{m}$ ) or it always works with a reduced spatial resolution. In addition, the field of view is fixed and there is no control of the size of the irradiated area. Secondly, its cost is quite high. Simpler and as efficient approaches can be obtained by going further back to wide-field microscopy but adding sectioning capability. Currently, one of the most successful approaches in developmental biology is selective plane illumination microscopy (SPIM) [18]. Unfortunately, *Drosophila* cuticle has a bad transmission and for imaging a small part of the cuticle is removed at the top of the head to get an optical access to the brain. This geometry is not compatible with SPIM implementation. T. Wilson's group had introduced an alternative technique for optical sectioning in wide-field microscopy [19] based on structured illumination. While the technique generates more photobleaching and cannot handle too dense labeling since it is based on an image subtraction principle, its implementation is more straightforward. In its initial version, the technique was quite slow (an acquisition rate of a few Hz when optimized) and suffered from several artefacts (see [20]). By introducing the HiLo principle [21, 22], Mertz's group largely improved the robustness of structured illumination approach against artefact and already improved speed in last implementation, with acquisition rate around 10 Hz [22]. This is still rather slow and in addition, this *in vivo* implementation was neither optimized nor characterized for high spatial resolution imaging. In this paper, we present a new implementation. It relies on a structured illumination strategy based on the HiLo concept but we took advantage of the micro-mirror array technology (DLP) to structure the illumination. The benefit is a tenfold increase of speed, reaching acquisition rate necessary for 3D monitoring of specific neural networks. We also took advantage of new high power LED illumination instead of laser illumination which avoids a trade-off between image quantification accuracy and speed, since averaging is necessary with laser illumination to remove granularities introduced by random nature of speckle patterns. We showed that this new implementation was compatible with high resolution imaging, with performance close to confocal microscopy but with acquisition rates above video rate.

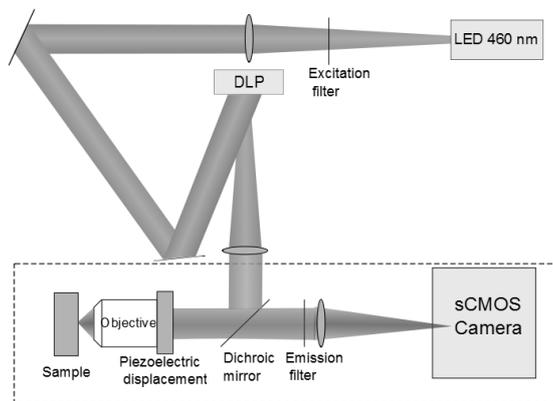


Fig. 1. Microscope setup. The LED beam (Prizmatix Ultra High Power LED, 460 nm, 2.5 W, 30 kHz) is shaped by a digital micro-mirror array (DLP Texas Instruments Discovery 4100 0.7 XGA 1024×768 micro-mirrors) to generate pattern used to perform optical sectioning. The typical power at the sample plan is about 1.5 mW. Excitation and emission beams are separated thanks to a dichroic mirror. The filtered fluorescence emission is recorded by a sCMOS camera (2560 pixels×2160 pixels, the pixels are square of 6.5  $\mu\text{m}$  long on each side). Dashed lines represent the vertical part of the set-up.

## 2. Experimental set-up

The set-up (Fig. 1) is close to a conventional epifluorescence microscope for GFP protein fluorescence imaging. The main difference is the matrix of micro-mirrors that shapes the illumination. An incoherent light source, the ultra-high power LED Prizmatix, provides the excitation beam at 460 nm with a spectral width of 27 nm. The beam is filtered by a bandpass filter at  $472 \pm 15\text{nm}$  and is sent to a matrix of rotatable micro-mirrors (DLP Texas Instruments Discovery 4100 0.7 XGA). This micro-electro-mechanical spatial light modulator is used to shape the excitation beam. Then, the beam is collimated before being reflected by a dichroic beamsplitter and sent onto the back aperture of a water immersion objective (Leica 40× 0.8 NA or Leica 25× 0.95 NA). The focal plane of the objective is conjugated with the DLP. The fluorescence emission from the sample goes through the objective. The output collimated beam is filtered by an emission filter at 525 nm with a spectral width of 35 nm and is imaged thanks to the tube lens onto a sCMOS camera (model Neo, Andor). The whole experiment is synchronized by a Labview program that we developed on a national instrument platform, through a multifunction data acquisition NI-USB bus to control accurately time during the image acquisition.

In the original implementation of structured illumination microscopy by Mertz's group, mechanical displacements of a diffuser plate [21] or a moving grid [23] limit the acquisition speed to video rate at the most after a tricky optimization. In order to shape the laser beam and generate different illumination patterns, we use the DLP high speed module developed by Vialux which is completely configured by a high speed FPGA logic and a USB controller firmware. Each micro-mirror of the DLP can move independently in two positions, either the reflection goes to the sample (the "on" position) or not (the "off" position). After optimization of the Labview control program, we reached a 2 kHz switching rate which corresponds to a 500  $\mu\text{s}$  illumination period with a DLP switching time of 6  $\mu\text{s}$ . It's therefore not the pattern switch which limits the acquisition speed but only the fluorescence amount emitted by the sample and the signal-to-noise ratio. In addition, thanks to the micromirror device, the pattern can be changed in real time with imaging depth to keep the best compromise between resolution and

brightness. As the light goes deep in the tissue, aberrations and scattering decrease the transmission of high frequency components. So it is crucial to be able to reduce the frequency of the illumination pattern to still get a signal even if the axial resolution is degraded. In fact, decreasing the frequency of the grid illumination corresponds in term of confocal microscopy to use a pinhole larger and so to get a thicker optical section. In a confocal microscope the pinhole size is however usually fixed during the recording of a 3D stack of images. Thanks to the high flexibility of the DLP, it is possible to adapt the pattern during the recording.

In the initial implementation, that was used for some of the characterization experiments, the excitation light source was a 488 nm diode laser with a maximum power of 50 mW. While it provided more power at the level of the sample than the LED, when we imaged biological samples with fine details, we realized that the captured section was degraded by random speckles of the illumination. Indeed, speckles were no longer averaged when switching from the slow moving diffuser to the fast switching micro-mirror matrix. Then, image details lose contrast and image quantification can be compromised if internal fluctuations of the living sample make the speckle pattern change. To conciliate high-speed imaging and resolution, we replace the laser by an ultra-high power LED.

### 3. Image processing

Image processing takes advantage of the robust HiLo approach introduced by J. Mertz's group [24]. An optical section requires to record two images, one with an uniform illumination and one with an illumination structured by a pattern that contains only high spatial frequencies except for a continuous component (high frequency grid pattern in our set-up). From those two images, high and low spatial frequency components of an optical section around the in-focus plane will be extracted separately (out of focus light contribution is suppressed for both types of components) and then recombined to get the final section. Properties of the optical transfer function of the microscope already ensure that high frequency components of the uniformly illuminated image come specifically from the in-focus plane, so high frequency components of the section  $I_{hi}(\vec{\rho})$  are extracted straightforwardly by high-pass filtering of the uniform image. The difficulty is the extraction of low frequency components. This extraction relies on properties of the image acquired with structured illumination. In our application, we aimed at high spatial resolution imaging in thick tissue and the rejection of out of focus light is more critical than for initial demonstration of the technique. So the initial algorithm of Mertz's group was slightly modified to improve this rejection. In more detail, the image intensities are given in Eq. (1):

$$\begin{aligned}
 I_u(\vec{\rho}) &= I_m(\vec{\rho}) + I_{out}(\vec{\rho}) \\
 I_s(\vec{\rho}) &= \frac{I_m(\vec{\rho})}{2} (1 + M \sin(2\pi f \vec{u} \cdot \vec{\rho}) + hf(\vec{\rho})) + \frac{I_{out}(\vec{\rho})}{2}
 \end{aligned} \tag{1}$$

where  $I_u(\vec{\rho})$ ,  $I_s(\vec{\rho})$ ,  $I_m(\vec{\rho})$  and  $I_{out}(\vec{\rho})$  are the uniform image, the structured image, the in and out-of-focus contributions respectively expressed in the spatial coordinate system  $\vec{\rho} = (\vec{x}, \vec{y})$ .  $M \sin(2\pi f \vec{u} \cdot \vec{\rho})$  is the first harmonic of the projected grating transmitted by the optical system into the sample where  $\vec{u}$  is the direction of the modulation pattern.  $hf(\vec{\rho})$  represents higher frequency harmonics that will be filtered out by the image processing. The light of the focal plane is modulated periodically by the grid. The reconstruction of optical sections is computed post-acquisition on the Matlab platform. Nevertheless, it is a rather fast treatment. In order to compute 500 images with  $512 \times 512$  pixels resolution (250 HiLo images), it takes about 35

seconds. The structured illumination image is used to find the missing low frequencies components. The difference of the two normalized images,  $I_{diff}(\vec{\rho})$ , is given in Eq. (2), that reads:

$$I_{diff}(\vec{\rho}) = \frac{I_u(\vec{\rho})}{\langle I_u(\vec{\rho}) \rangle} - \frac{I_s(\vec{\rho})}{\langle I_s(\vec{\rho}) \rangle} = -\frac{I_{in}(\vec{\rho})}{\langle I_u(\vec{\rho}) \rangle} (M \sin(2\pi f \vec{u} \cdot \vec{\rho}) + hf(\vec{\rho})) + noise \quad (2)$$

where  $\langle I \rangle$  is the mean value of the image  $I$ . With  $\langle I_u(\vec{\rho}) \rangle = 2 \langle I_s(\vec{\rho}) \rangle$ , the difference image can be expressed only with the in-focus information modulated by the grid-like pattern. We add the new term *noise* because of photon noise fundamentally and also because of internal modifications of the living sample (circulation for instance) that can slightly modified the illumination. Due to modulation (*sin* term in Eq.(2)), the low frequency components of the section  $I_{in}(\vec{\rho})$  are not contained in the low frequency region but around the frequency of the grid in the frequency plane of the difference image. It is an optical analog of the radio amplitude modulation (AM). The modulation of the illumination acts as a high frequency "carrier" for the information of the sectioned image. To specifically extract it and to remove as much as possible the noise, it is helpful to filter the difference image to keep spectral components close to the grid frequency (with a bandwidth corresponding to that of the information to be extracted). Thus, we applied a filter  $F_{2g}$  composed of two gaussian functions centered on the illumination pattern spatial frequencies  $\pm k\vec{g}$ . It is the main difference with J. Mertz's group treatment [23]. The expression of the filter  $F_{2g}$  reads:

$$F_{2g}(k_x, k_y) = \exp\left(-\frac{(k_x + k_{gx})^2 + (k_y + k_{gy})^2}{2\sigma^2}\right) + \exp\left(-\frac{(k_x - k_{gx})^2 + (k_y - k_{gy})^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3)$$

The  $\sigma$  width parameter is chosen to optimize the bandpass around the pattern frequency to extract correctly the in-focus low frequency information. The remaining of the treatment to extract the low frequency information is then the same as previous treatment. It is basically a conventional demodulation, as done to extract the low frequency audio signal from the AM radio signal with a low-pass filter complementary to the high-pass filter used for  $I_{high}(\vec{\rho})$  extraction. Thus, we got  $I_{low}(\vec{\rho})$ , the low frequency components of  $I_{in}(\vec{\rho})$ . The optical section is finally got by combining the image  $I_{high}(\vec{\rho})$  and  $I_{low}(\vec{\rho})$  containing respectively high and low frequency components of the section with a reconstruction factor  $\eta$  as given in Eq. (4). This factor equals  $\pi$  if the fundamental frequency of the grid pattern is well transmitted and it is inversely proportional to the modulation of the projected pattern. In complex samples that affects the OTF and  $\eta$  can be determined by matching the spectral densities in the images  $I_{high}(\vec{\rho})$  and  $I_{low}(\vec{\rho})$  at the cutting frequency of the complementary high and low-pass filters used for  $I_{high}(\vec{\rho})$  and  $I_{low}(\vec{\rho})$  extractions.

$$I_{HiLo}(\vec{\rho}) = I_{high}(\vec{\rho}) + \eta I_{low}(\vec{\rho}) \quad (4)$$

#### 4. Characterization of the microscope

First, we studied the Point Spread Function (PSF) of our microscope. We imaged 100 nm beads doped with fluorescein in agarose, a diameter well below the resolution of our system. For such a point object, there is no difference between the HiLo image and the wide-field image except the removal of out-of-focus wings for defocused images, that are already quite small. Thus, the determination of lateral and axial resolutions was carried out only on uniform images. We got mean lateral and axial bead sizes of  $440 \pm 40$  nm and  $2.0 \pm 0.1$   $\mu\text{m}$  respectively, assuming

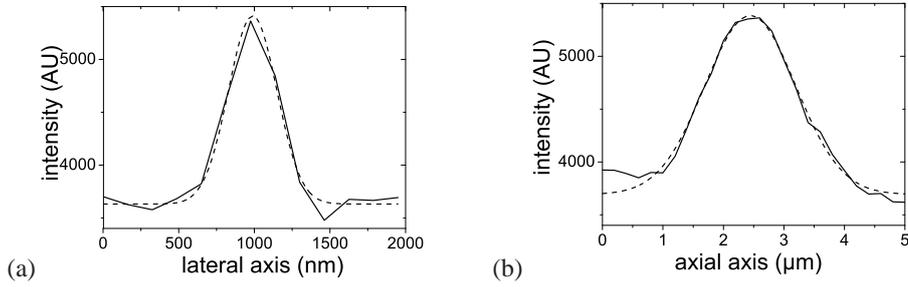


Fig. 2. Determination of PSF with 100 nm diameter fluorescent beads. (a) Lateral PSF. (b) axial PSF. Experimental results (straight line) and gaussian fits (dotted line) giving lateral and axial FWHM of  $440 \pm 40$  nm and  $2.0 \pm 0.1$   $\mu\text{m}$  respectively after calculations on four beads of the sample. Leica Objective  $40\times 0.8$  NA.

gaussian fits [25] (see Fig. 2). This led to a lateral PSF of  $430 \pm 40$  nm and an axial PSF of  $2.0 \pm 0.1$   $\mu\text{m}$  thanks to Eq. (5) that reads:

$$\begin{aligned} \text{Object} \otimes \text{PSF} &= \text{Image} \\ \sqrt{\text{FWHM}_{\text{object}}^2 + \text{PSF}^2} &= \text{FWHM}_{\text{image}} \end{aligned} \quad (5)$$

Assuming a diffraction-limited system [26], theoretical lateral and axial Full Width Half Maximum (FWHM) of the PSF (see Eq. (6)) equal to 340 nm and 1.8  $\mu\text{m}$  respectively for a numerical aperture NA of 0.8, an index of refraction in the medium between the focal point and the objective of 1.33 and an wavelength  $\lambda$  of 520 nm (peak emission of fluorescein). Comparing experimental and theoretical lateral PSF, the effective numerical aperture  $\text{NA}_{\text{eff}}$  of the objective equals to 0.6.

$$\begin{aligned} \text{FWHM}_{x,y} &= \frac{0.51 \lambda}{\text{NA}} \\ \text{FWHM}_z &= \frac{0.88 \lambda}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}} \end{aligned} \quad (6)$$

We completed the characterization of our microscope by determining its spatial frequency response. We imaged DLP patterns onto a plane mirror as sample. The DLP was illuminated with a white light source filtered by a large band blue filter (Schott, BG12). We tested different line periods from 2 to 64 DLP pixels for the illumination pattern shaped by the DLP. Thus, contrary to the previous experiment, the frequency response depends on the illumination arm. A line period of 2 DLP pixels is the smallest that we can create due to the DLP and one DLP pixel is a square of 13.7  $\mu\text{m}$  side. We determined the contrast  $C$  of the lines by calculating the standard deviation of the difference of the two normalized images (with uniform and structured illumination) where only the first harmonic of the projected pattern is kept as given in Eq. (7).

$$C = \sigma \left[ \frac{I_{in}(\vec{\rho})}{\langle I_u(\vec{\rho}) \rangle} (M \sin(2\pi f \vec{u} \cdot \vec{\rho})) \right] \quad (7)$$

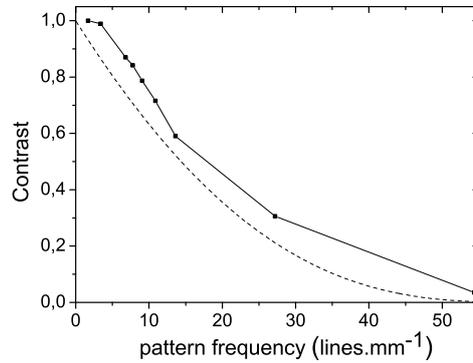


Fig. 3. (Dashed line) Theoretical optical transfer function for an incoherent system of  $2f_0$  cut-off frequency with  $f_0 = 31 \text{ lines.mm}^{-1}$ . (Straight line) Normalized experimental evolution of contrast on camera images for different line periods: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 32 and 64 DLP pixels. The results are presented in spatial frequencies space where 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16 and 32 DLP pixels correspond to pattern frequency of 51.6, 25.8, 12.9, 10.3, 8.6, 7.4, 6.5, 3.2 and 1.6  $\text{lines.mm}^{-1}$  respectively. Leica Objective  $40\times 0.8 \text{ NA}$ .

$\sigma$  refer to standard deviation. Results of the contrast measurements are given in Fig. 3. The contrast is maximal and equals to 1 for the 64 DLP pixels lines and decreases when the line spatial frequency increases. The cut-off frequency of our optical system seems to be about  $50 \pm 10 \text{ lines.mm}^{-1}$ . It corresponds to a size of  $500 \pm 100 \text{ nm}$  for the smallest object resolvable by the optical system. This is in good agreement with the lateral PSF determined by the previous experiment. The theoretical optical transfer function (OTF) of an incoherent diffraction-limited system with circular pupils [27] is given by the Eq. (8) and also represented in Fig. 3.

$$OTF(f) = \left\{ \frac{2}{\pi} \left[ \arccos\left(\frac{f}{2f_0}\right) - \frac{f}{2f_0} \sqrt{1 - \left(\frac{f}{2f_0}\right)^2} \right] \right\}^2 \quad (8)$$

$$f_0 = \frac{NA_{eff}}{\lambda m} = 31 \text{ l.mm}^{-1} \quad (9)$$

$f_0$  is the cut-off frequency of the corresponding coherent diffraction-limited system given by the Eq. (9) where  $m$  is the 40 magnifying factor of the objective. We got for a half-contrast a frequency of about  $18 \text{ lines.mm}^{-1}$  and  $15 \text{ lines.mm}^{-1}$  experimentally and theoretically respectively. We observed an experimental contrast close but slightly above the theoretical one. This is related to terms that we have not taken into account in our simple theoretical model. First, even in the absence of any true modulation of the recorded image in structured illumination, the photon noise that is only partially eliminated through our bandwidth filter, will give a small contribution to the contrast. In addition, the projected pattern is a grid and for low frequency modulation several harmonics with a large amplitude are transmitted by the optical system. We applied a gaussian filter to eliminate most of them but for low frequency modulation they give also a small contribution.

We evaluated experimentally the optical sectioning strength of our microscope with a thin fluorescent sample. We spin-coated a poly(methyl methacrylate) film (1% weight vs volume) doped with Rhodamine 6G on a glass slide. We focused on the evolution of the axial resolution for three different line periods: 4, 8, and 16 DLP pixels corresponding to patterns of 1, 2 and

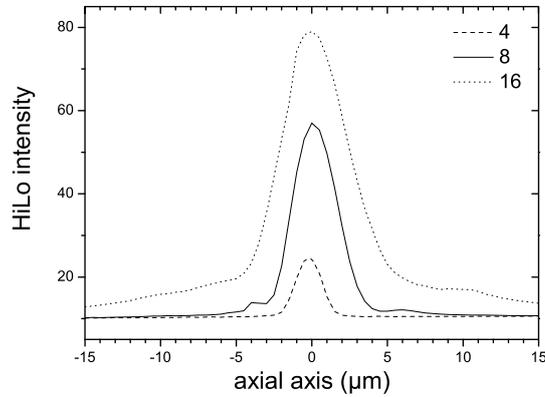


Fig. 4. Axial HiLo profiles for three line periods: 4 (dotted line), 8 (straight line) and 16 (dashed line) DLP pixels line periods. We got a Full Width Half Maximum (FWHM) of  $5.5 \mu\text{m}$ ,  $3.3 \mu\text{m}$  and  $2.0 \mu\text{m}$  for 16, 8 and 4 DLP pixels line periods respectively assuming gaussian fits. Leica objective  $40\times 0.8 \text{ NA}$ .

$4 \mu\text{m}$  period respectively on the sample (Fig. 4). The HiLo intensity is maximal when the focal plane of the objective coincides with the thin fluorescent sample and decreases gradually to approach zero. The thickness of the HiLo optical section increases with the fringe period of the pattern. We got for a gaussian fit of the HiLo intensity a FWHM of  $5.5 \mu\text{m}$ ,  $3.3 \mu\text{m}$  and  $2.0 \mu\text{m}$  for 16, 8 and 4 DLP pixels line periods respectively. Starting from analytical expression of transfer function of perfect imaging system in incoherent light [28], we can derive the expression of the sectioning thickness when only the first harmonic of the grating is kept to reconstruct the section. Its expression is given in Eq. (10) that reads:

$$OTF = \left\{ 2 \left[ 1 - 0.69 \frac{f}{f_0} + 0.0076 \left( \frac{f}{f_0} \right)^2 + 0.043 \left( \frac{f}{f_0} \right)^3 \right] \frac{J_1 \left( \frac{4\pi w n}{\lambda} \frac{f}{f_0} - \frac{2\pi w n}{\lambda} \left( \frac{f}{f_0} \right)^2 \right)}{\frac{4\pi w n}{\lambda} \frac{f}{f_0} - \frac{2\pi w n}{\lambda} \left( \frac{f}{f_0} \right)^2} \right\}^2 ; \quad (10)$$

$$\text{where } w = -\frac{f_{tube}}{m} - \frac{z}{n} \sqrt{n^2 - NA_{eff}^2} + \left[ \left( \frac{f_{tube}}{m} \right)^2 + \frac{2z f_{tube}}{m} + z^2 \left( 1 - \frac{NA_{eff}^2}{n^2} \right) \right]^{\frac{1}{2}}$$

where  $J_1$  is the first order Bessel function and  $f_{tube}$  refers to the focal length of the tube lens which is equal to 20 cm. The section thickness is simply the FWHM of that function. We got theoretical optical section thickness  $\Delta z$  of  $6.2 \mu\text{m}$ ,  $3.6 \mu\text{m}$  and  $2.4 \mu\text{m}$  for 16, 8 and 4 DLP pixels line periods respectively, in good agreement with experimental results. The higher the line spatial frequency is, the thinner the optical section gets. High spatial frequencies components decrease faster than small spatial frequencies with the defocusing of the pattern. Nevertheless, as depicted by the Fig. 3, the line contrast is degraded for lines with frequency near the cut-off frequency of the optical system. The effective number of photons from the section contributing to the final image decreases leading to a degradation of the signal-to-noise ratio. A compromise between axial resolution and sizeable contrast has to be found to determine the fitted line periods. 8 (and eventually 4) DLP pixels line period is suitable to our biological

applications.

Finally, to evaluate the quality of the reconstruction from a stack of sections, we imaged

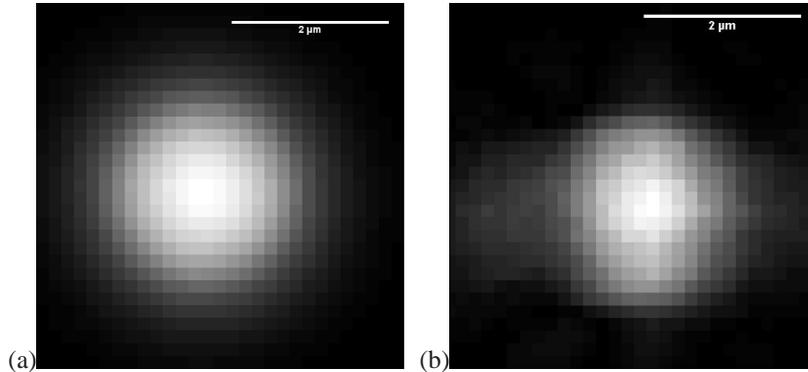


Fig. 5.  $2\ \mu\text{m}$  diameter fluorescent bead HiLo images for 4 DLP pixels line period. (a) Lateral view (X, Y). (b) Reconstruction of an axial view (Z, Y). Optical sections are separated by a step of  $0.2\ \mu\text{m}$ . Leica objective  $40\times$  NA 0.8.

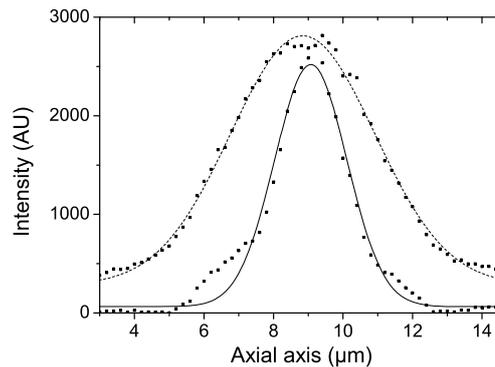


Fig. 6. Axial profiles of the  $2\ \mu\text{m}$  diameter fluorescent bead for wide-field microscopy (dotted line) and HiLo microscopy (straight line). We got an axial bead size of  $5.5\ \mu\text{m}$  and  $2.8\ \mu\text{m}$  for wide-field and HiLo microscopy respectively taking account the medium change from water to agarose of respective refractive index of 1.33 and 1.5.

$2\ \mu\text{m}$  fluorescent beads. We plotted the intensity cross-section along the spatial dimensions. As expected, we got  $2.2 \pm 0.1\ \mu\text{m}$  for both transversal dimensions of the bead in accord with the lateral PSF (Fig. 5(a)). In order to evaluate the axial resolution, we follow the bead center pixel intensity all along the HiLo images of the 3D stack (Fig. 5(b)). On the Fig. 6, results of axial resolution for wide-field and HiLo microscopy are shown. As the bead size is well above diffraction limit, we observed clearly out-of-focus light rejection for HiLo images. Gaussian fits gave a  $2.8\ \mu\text{m}$  FWHM for the HiLo image compared to  $5.5\ \mu\text{m}$  for the wide field image, where there is no efficient rejection of the out-of-focus light. Fluorescent beads are well resolved in the three dimensions. Thus, our microscope is suitable to our biological samples with  $2\ \mu\text{m}$  typical size structures.

## 5. Application to biology: Morphological and functional studies of drosophila brain

We evaluated our microscope's performance on model samples as thin fluorescent sample and known diameter beads. We checked the ability to find this performance when we imaged a real biological sample. Here we present results of *in vivo* imaging of the *drosophila melanogaster* brain and especially of a region called the mushroom bodies (MB) [29]. The MB were demonstrated to be the center of the olfactory memory system [8, 30]. Flies carrying the genetically encoded fluorescent probes UAS-CD8-GFP or UAS-NLS-GFP (NLS is set for Nuclear Localization Signal) were crossed with 238Y-Gal4 flies to drive GFP expression in all MB intrinsic neurons, so-called Kenyon cells, thanks to the UAS-Gal4 system [31]. The flies were reared at a controlled temperature (25°C). For *in vivo* imaging, the fly was glued by the dorsal part of its head and thorax on a plastic film. Then a small aperture was made in the plastic film at the level of the head to remove the underlying cuticle and tracheae. The brain was bathed during the experiment with physiological Ringer's solution containing (in mM) 130 NaCl, 5 KCl, 36 C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> sucrose, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub> and 5 HEPES NaOH [pH = 7.3] (see [32] for more details about fly preparation).

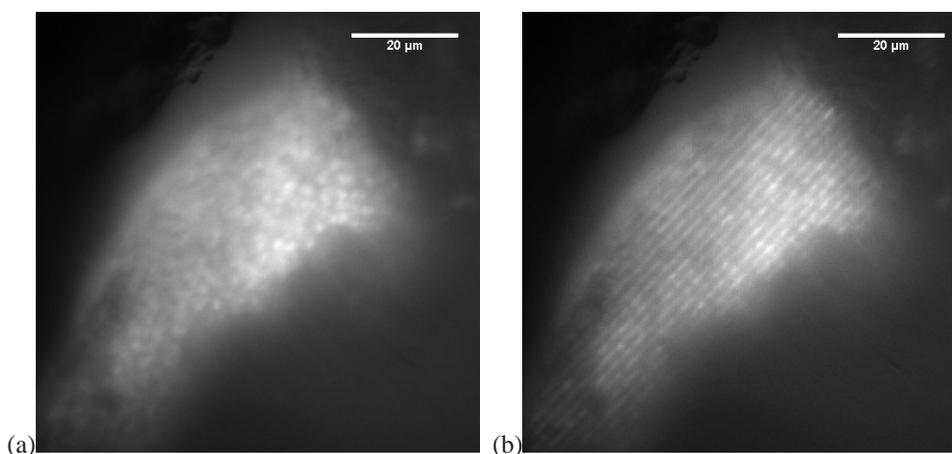


Fig. 7. Kenyon cells of the MB of a 238Y-Gal4/+; UAS-NLS-GFP/+ labeled fly. (a) Image with uniform illumination, (b) with structured illumination (line of 8 pixels period on the DLP) for optical sectioning with Hilo reconstruction. (Leica 25× 0.95 NA. 512×512 pixels images. Coherent laser 488 nm)

We compared images taken by our microscope with those taken by confocal microscopy, a high resolution reference technique for *drosophila* neuro-imaging. Figure 7 shows images of the soma of Kenyon cells for flies of genotype 238Y-Gal4/+; UAS-NLS-GFP/+. These flies expressed a nuclear GFP specifically in MB Kenyon cell nucleus. The Fig. 7(a) obtained with uniform illumination corresponds to traditional wide-field microscopy. The absence of sectioning ability of this technique resulted in a blurred image. Structured illumination image is shown on Fig. 7(b). It was also a blurred image with a strip pattern but, combined with the uniform illumination image (Fig. 7(a)), it can be processed with the numerical treatment described above to reconstruct the section shown on Fig. 8(a). Out-of-focus fluorescence was rejected. The genetically encoded fluorescent probe UAS-GFP-NLS is expressed in the cell nucleus of about 2 μm typical size, which are well resolved by our microscope which gave equivalent images to those of the confocal microscope (Fig. 8(b)). In Fig. 9, HiLo and confocal images were obtained by crossing 238Y-Gal4 flies and UAS-CD8-GFP flies so that GFP was targeted to plasma

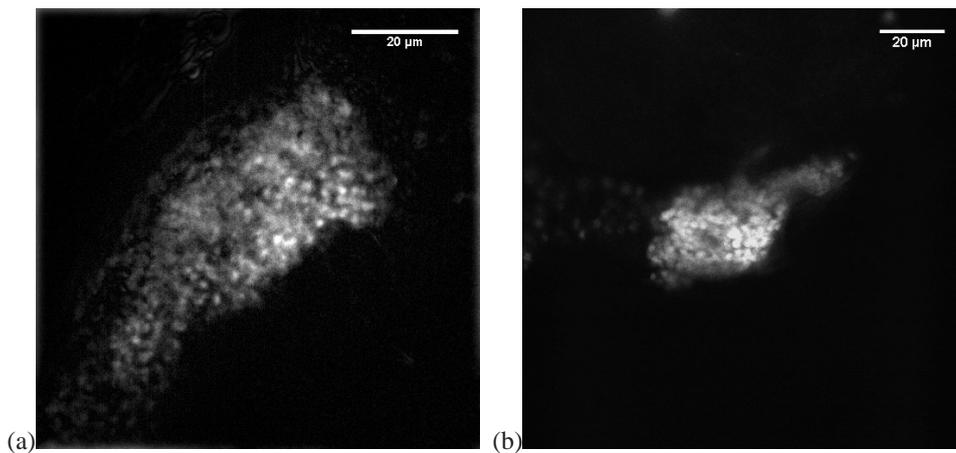


Fig. 8. Kenyon cells of the MB of a 238Y-Gal4/+; UAS-NLS-GFP/+ labeled fly. (a) Hilo image with a 2 reconstruction factor (Leica objective  $25\times 0.95$  NA,  $512\times 512$  pixels images). (b) Confocal image (Nikon objective  $25\times 0.95$  NA,  $512\times 512$  pixels images).

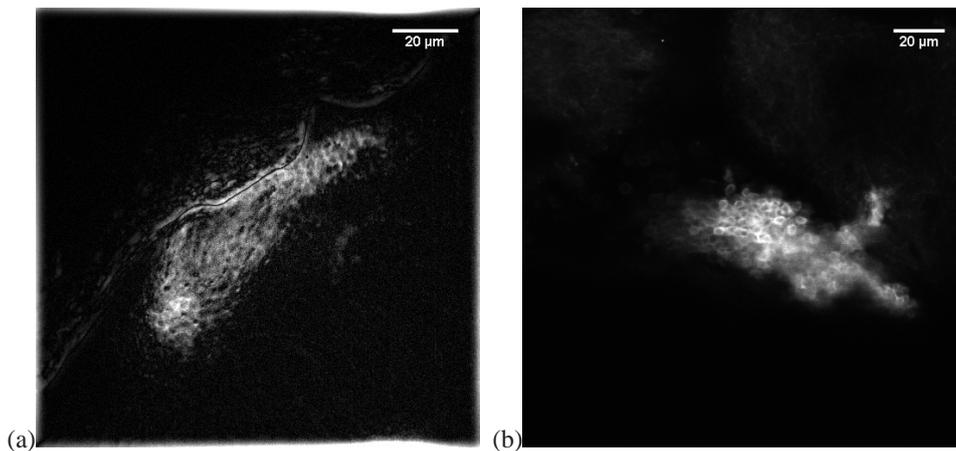


Fig. 9. Kenyon cells of the MB of a 238Y-Gal4/+; UAS-CD8-GFP/+ labeled fly. (a) Hilo image with a 2 reconstruction factor (Leica objective  $25\times 0.95$  NA,  $512\times 512$  pixels images). We used an incoherent source of light to avoid laser speckle and correctly image the cell membranes. (b) Confocal image (Olympus objective  $25\times 1$  NA,  $512\times 512$  pixels images).

membranes of Kenyon cells. It is noteworthy that the images of the cell bodies nucleus and the cell bodies membranes looks like complementary even though the typical size of a these neuron cell bodies are closed to  $2\ \mu\text{m}$ . Our microscope kept an excellent resolution even for in vivo imaging where the main limitations for spatial resolution came from sample aberrations and diffusion and to a smaller extend from residual small movements of the preparation. Therefore, our micromirror structured illumination microscope working with an incoherent excitation source succeeded in high resolution imaging as the commonly used confocal microscope.

The scanning time of the confocal microscopy is a major limiting factor for in vivo imaging

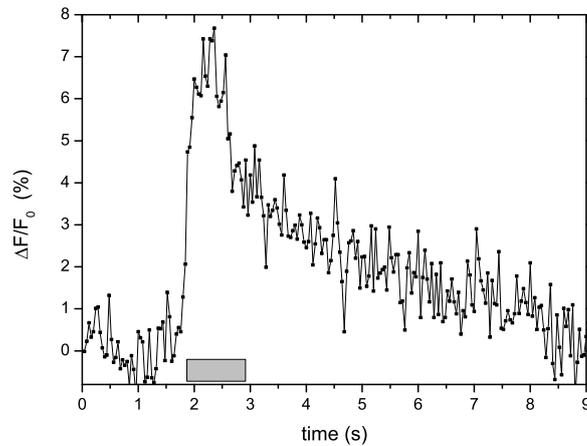


Fig. 10. Variation of Gcamp3 fluorescence in alpha branch after an electric shock of  $6 \mu\text{A}$ . The shock is delivered during 1 s represented by the gray bar. Data are presented for the region of interest as  $\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F - F_0}{F_0}$  where  $F_0$  is the baseline before the electric stimulus and  $F$  represents the background-subtracted emission fluorescence HiLo intensity of Gcamp3.

especially to follow in real time neurobiological functional responses. A last experiment was realized to demonstrate the main advantage of our set-up over confocal : sensitivity and speed. We followed the response to electric shock stimuli by fast calcium imaging. The stimulus was delivered in constant current mode through two gold electrodes touching the fly's body. The flies were obtained by crossing flies carrying the genetically encoded calcium sensor Gcamp3 with 238Y-Gal4 flies. Gcamp3 fluorescence rate increases with the calcium concentration under a constant illumination [33]. Figure 10 shows the response to an electric shock of  $6 \mu\text{A}$  applied during 1 s. We observe an increase of about 7% of the fluorescence emission after the electric shock delivery which corresponds to a transient local increase of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the  $\alpha$  branch of the mushroom bodies (see [29] for drosophila brain structure details). This good signal-to-noise ratio was performed even though the exposure time for every  $512 \times 512$  pixels uniform and structured images was only 10 ms. The frame rate of 30 Hz is similar to video rate. We are able to decrease technologically again this exposure time because our microscope is based on the wide-field technique and the DLP can perform in the microsecond range the switch between uniform and structured illuminations. The main limitation for our experiment remains the signal-to-noise ratio. Typically confocal microscopy imaging in drosophila brain are in the Hz range. Five hertz frame rate confocal imaging were used for example to focus on the mnemonic traces in  $\alpha$  and  $\beta$  MB neurons after conditioning [34] or to study the ability of Kenyon cells dendrites to release synaptic vesicles [35] with images of relatively small resolution.

## 6. Conclusion

We implemented a new fast optical microscope based on the structured illumination by a digital micromirror device. After optimization and suppression of coherent artefacts observed with a laser light source, we obtained a diffraction limited spatial resolution laterally and axially. Images recorded on synthetic model samples as well as in vivo brain imaging showed that

the developed instrument spatial resolution is close to that of the confocal microscope. It is equivalent laterally and the optical sectioning thickness is slightly larger but close to confocal performance. Nevertheless, our microscope has two major advantages with respect to confocal microscopy. The combination of wide field illumination with the rapidity of micromirror device allowed to acquire images at a rate larger than 30 Hz, that is more than one order of magnitude faster than a typical confocal microscope on the same type of sample for the same spatial resolution (512×512 pixels). As the illumination can be changed rapidly, an advantage of the instrument that we did not use in this study, is to adjust in real time the spatial frequency with the imaging depth in the biological sample. Indeed, as in confocal microscopy the pin-hole can be opened to keep the best compromise between resolution and brightness (but not in real time during a stack recording), the spatial frequency can be reduced for the same purpose in structured illumination microscopy because diffusion and aberrations will attenuate the transmission of higher spatial frequencies. In conclusion, the speed and the resolution of the instrument will open the opportunity to analyze more globally the activity of neural networks involved in different biological functions. The targeted biological sample was drosophila brain but such an approach should benefit to other organisms with genetically targeted sparse labeling as zebrafish for example.

### **Acknowledgments**

This work was supported for Aimé Cotton team by the region Ile-de-France (Sesame contract) and the Federation Lumat.





Article 2 : Sensorless adaptive optics  
implementation in widefield optical sectioning  
microscopy inside *in vivo* drosophila brain

# Sensorless adaptive optics implementation in widefield optical sectioning microscopy inside *in vivo* drosophila brain

Mélanie Pedrazzani<sup>a</sup>, Vincent Loriette<sup>b,\*</sup>, Paul Tchenio<sup>a,c</sup>, Sakina Benrezzak<sup>a</sup>, Daniele Nutarelli<sup>a</sup>, Alexandra Fragola<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire Aimé Cotton, CNRS, Univ. Paris-Sud, ENS Cachan, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux, CNRS, ESPCI, 10 Rue Vauquelin, 75005 Paris, France

<sup>c</sup>Gènes et Dynamiques des Systèmes de Mémoire, Unité de neurobiologie, CNRS, ESPCI, 10 Rue Vauquelin, 75005 Paris, France

**Abstract.** In this paper, we present an implementation of a sensorless adaptive optics loop in a widefield fluorescence microscope. This setup is designed to compensate the aberrations induced by the sample on both excitation and emission pathways. It allows fast optical sectioning inside a living drosophila brain. We present a detailed characterization of the system performances. We prove the gain brought to optical sectioning by realizing structured illumination microscopy with adaptive optics down to fifty micrometers deep inside living drosophila brain.

**Keywords:** adaptive optics, structured illumination microscopy, biological imaging.

\*Vincent Loriette, [vincent.loriette@espci.fr](mailto:vincent.loriette@espci.fr)

## 1 Introduction

Fluorescence microscopy is the technique of choice for *in vivo* functional imaging when micrometric spatial resolution and high sensitivity are required. Among the different imaging techniques that can be used for fast *in vivo* dynamic studies,<sup>1,2</sup> we have chosen a widefield approach as it requires low excitation power density and provides efficient use of the excitation photons. However, when imaging deep inside biological tissues, its performances are strongly limited by out-of-focus fluorescence emission. Optical sectioning using structured illumination, such as HiLo microscopy (for High and Low spatial frequencies), efficiently overcomes this limitation while preserving high frame rate as it only requires two images to be acquired.<sup>2</sup> Its capability to provide high-resolution images *in vivo* into the drosophila brain has already been demonstrated<sup>3</sup> but is limited to near surface imaging due to the decrease of the contrast of the illumination pattern deep inside the brain. This contrast degradation is due to light scattering which induces a high background and to wave-

front distortion by the aberrant nature of the tissue structures. In order to build optical sections, it is mandatory to have a high contrast of the illumination pattern in the microscope object plane, so it is essential to preserve it when imaging deeper than twenty micrometers. We chose to correct the sample induced aberrations by shaping the wavefront with a deformable mirror.<sup>4-6</sup> Two main strategies have been recently developed for adaptive optics implementation on widefield fluorescent microscopes: correction either using a measured wavefront coming from a “star” inside the sample<sup>7-9</sup> or by estimating a merit factor in the acquired image.<sup>10</sup> As in our case it was not possible to insert fluorescent beacons within the living drosophila brain, we implemented a sensorless approach with an image based optimization method. This approach is certainly slower than guide star based wavefront correction optimization, but it does not add constraints to the sample preparation, and turns to be more versatile as it does not rely on the position of a given beacon and can be easily targeted on a region of interest in the sample.

In this article, we will show that it is not possible to use patterned illumination methods deeper than 20  $\mu\text{m}$  inside the drosophila brain without correcting the aberrations induced by the sample. We will then prove that by implementing an adaptive optics loop with its wavefront shaping element placed in a location common to the excitation and emission paths we are able to preserve the contrast of the illumination pattern and provide aberration corrected fluorescence images at depths down to 50  $\mu\text{m}$ . We will discuss the choice of the optimization criterion to optimize the excitation and emission optical pathways. The characterization of our setup will give us estimates of the largest area that may be corrected of its aberrations, the thickness and the duration over which a given wavefront aberration can be maintained to recover good quality fluorescence images. We will then compare optical sections obtained using the HiLo technique for different levels of correction. We will end by discussing some strategies that could be implemented for high speed 3D

imaging into living brain.

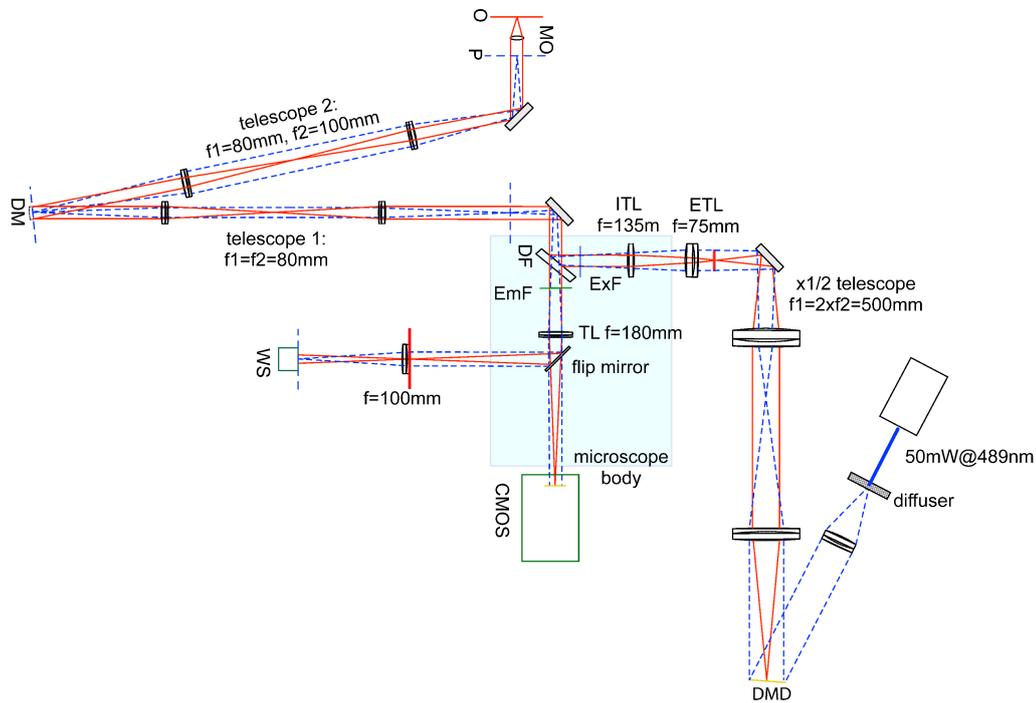
## 2 Material and methods

### 2.1 Biological sample preparation

Flies carrying the genetically encoded fluorescent probes UAS-CD8-GFP are crossed with 238Y-Gal4 flies to drive GFP expression in all mushroom bodies intrinsic neurons, so-called Kenyon cells, thanks to the UAS-Gal4 system.<sup>11</sup> The flies are reared at a controlled temperature of 25°C. For *in vivo* imaging, the fly is glued by the dorsal part of its head and thorax on a plastic film. A small aperture is made in the plastic film at the level of the head to remove the underlying cuticle and tracheae according to standard procedure.<sup>12</sup> The brain is bathed during all the experiment with physiological Ringer's solution containing (in mM) 130 NaCl, 5 KCl, 36 C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> sucrose, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub> and 5 HEPES NaOH [pH = 7.3]. In order to prevent most movements of the brain, we put in place an agarose gel (A9414, Sigma Aldrich, 2% massic concentration) above the brain. A rough estimate of the residual movements is a few micrometers with a typical frequency of a 1 Hz.

### 2.2 Optical device

We chose to build our microscope starting from a commercial microscope stage, as it provides excellent mechanical stability, numerous readily available optical ports and an optimized optical design. As our goal is to correct simultaneously the aberrations induced by the sample and the aberrations present in the illumination path, we inserted a deformable mirror at a location common to excitation and emission.



**Fig 1** Microscope setup. The setup can be decomposed in different parts. The excitation part is composed of the diode laser and the digital micromirror device (DMD) to create a structured illumination. The aberration correction part includes the deformable mirror (DM) in a plane conjugated to the pupil of the objective in a place common to excitation and detection. A CMOS camera is used to image fluorescence signals. The Shack-Hartman wavefront sensor (WS) is only used to correct static aberrations of the setup prior to imaging and create required matrix command to run the optimization algorithm. The blue and red lines correspond to planes conjugate of the deformable mirror and to the object plane respectively. The notations MO, TL, DF, P, O, ETL, ITL, ExF and EmF are used for microscope objective, tube lens, dichroic filter, pupil plane, object plane, external tube lens, illumination tube lens, excitation filter and emission filter respectively.

Our microscope design is drawn in Fig. 1. The setup is based on a commercial inverted fluorescence microscope (Olympus IX 71). The 15 millimeter diameter deformable mirror DM (Imagine Optic, Mirao e52) is placed in a plane conjugate of the microscope objective exit pupil (Leica, Fluotar 25 $\times$ , 0.95 W). As can be seen in Fig. 1, the DM lies at a location common to excitation and emission pathways, in order to correct the aberrations present in the imaging path, as well as aberrations present between the patterning element and the sample. Design constraints led to place the DM slightly tilted with respect to the optical axis. We did not find experimental evidence that

this tilt has any effect on the efficiency of the wavefront correction. The first afocal arrangement allows the DM to be placed outside of the microscope body, and the second afocal is used to match the size of the DM to the size of the objective pupil. We build the two telescopes using commercially available one inch diameter achromatic doublets. A digital micromirror device DMD (Texas Instruments Discovery 4100 0.7 XGA) conjugate of the objective front focal plane of the microscope objective is used to pattern the excitation light (Cube laser 488 nm 50 mW, Coherent). A diffuser is used to reduce the spatial coherence of the laser source in order to provide speckle-free illumination. The axial position of the image of the DMD projected in the sample is set by adjusting the length and position of the telescope which conjugates the DMD to the microscope field diaphragm. Laser excitation and fluorescence emission are split by a dichroic mirror (DF) and a high-pass filter (Z488RDC and 500LP from Chroma Technology) within the microscope stage. Fluorescence images are recorded on a complementary metal-oxide semiconductor (CMOS) camera (Hamamatsu, Orca-Flash 4.0) plugged on the tri-ocular microscope head. The emission light can be directed on a Shack-Hartmann wavefront sensor WS (Imagine Optic, Haso3 first), conjugate of the DM, thanks to a flipping mirror. The lens placed in front of the WS, used to conjugate the WS to the DM, is not part of the excitation or emission path. It is placed in a plane conjugate of the sample. Therefore this field lens affects the wavefront only to a low extent. The wavefront sensor is employed only during the initial setup phase but it is not used during the optimization process.

### 2.3 *Optimization algorithm*

We used the optimization algorithm software MicAO provided by Imagine Optic company and developed a merit factor adapted to structured illumination microscopy. The optimization process

aims at minimizing a merit factor computed from the acquired images, by sequentially compensating the wavefront aberrations, these aberrations being decomposed on the classical Zernike basis. Starting from an initial mirror shape, a fixed amount of a single aberration is added and then subtracted. We thus measure three values of the merit factor for each aberration. A parabolic fit allows to find the best mirror shape to compensate this particular aberration. The next aberration is compensated the same way, this time starting with the mirror shape obtained previously. We compensate all the third order aberrations except defocus, tip and tilt. Only the fifth order spherical aberration is corrected because we observed that compensating the other fifth order aberrations do not improve the quality of the images. By including all the fifth order aberrations, the correction does not vary by more than 10 nm RMS. We do not use a basis specifically designed for a particular merit function, so it is not guaranteed that at the end of the optimization step, the best mirror shape is obtained. However we verified that the final value of the merit factor does not depend on the number of optimization runs we perform. So even if our aberration basis is not orthogonal for a given merit factor, it is suitable enough to lead to improvements throughout the optimization process. The improvement of the wavefront quality obtained using this basis is sufficient for our application, but we can not guarantee that we are able to obtain the best wavefront improvement. The choice of the merit function strongly depends on the sample characteristics and the illumination technique.<sup>13</sup> When testing our setup with fluorescent beads we can use standard merit factors like Sobel or Laplace. In the case of *in vivo* imaging of drosophila brains, we record very noisy images with weak contrasts and no sharp discontinuities because of high out-of-focus fluorescence background, so Sobel or Laplace based optimizations usually fail. As we do not use isolated guide stars and wish to perform wide field optimization, we have to create an equivalent “wide field guide star” to feed our merit factor. The patterned illumination by a grid provides us with this guide star

as we know what should be its image in absence of aberration. The illumination-based merit factor is defined as the integral of the power spectral density of each image in gaussian windows centered on the peaks of Fourier spectrum of the illumination pattern. The merit factor  $M$  is computed by :

$$M = \left( \iint |G(f_x, f_y) \mathcal{F}(I)|^2 df_x df_y \right)^{-1}, \quad (1)$$

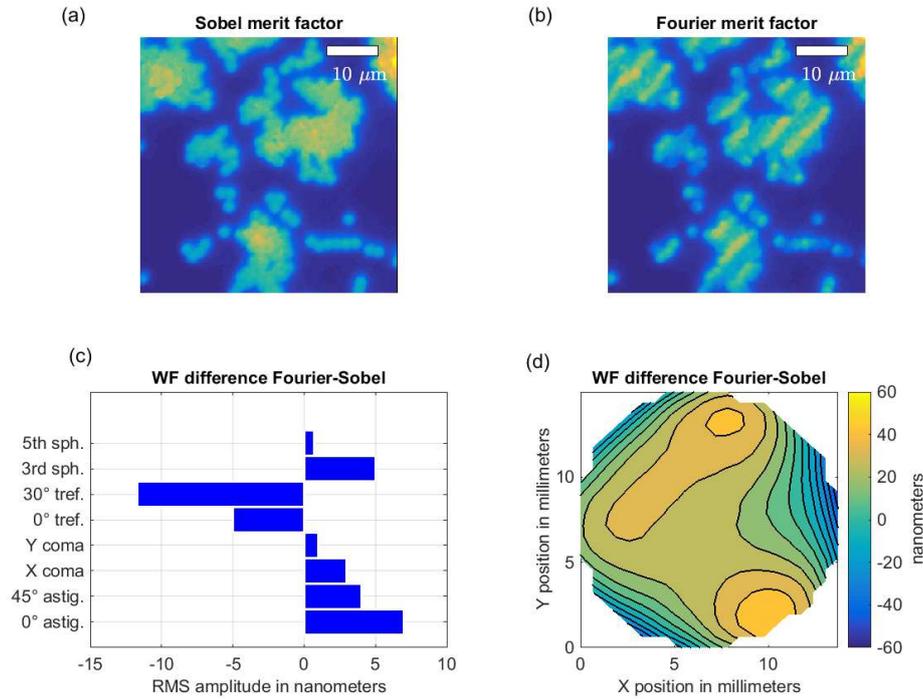
where  $\mathcal{F}(I)$  is the Fourier transform of the image  $I$ .  $G$  is a gaussian filter of width  $w$  centered on the spatial frequency  $(f_{x,\text{mod}}, f_{y,\text{mod}})$  of the pattern, i.e.

$$G(f_x, f_y) = \exp \left[ -\frac{(f_x - f_{x,\text{mod}})^2 + (f_y - f_{y,\text{mod}})^2}{w^2} \right]. \quad (2)$$

Optimizing this merit factor  $M$  is equivalent to maximizing the contrast of the pattern imaged on the camera. The choice of the spatial frequency of the illumination pattern is dictated by two opposite constraints : if the frequency is high, close to the microscope cutoff frequency, the contrast of the pattern is low, the merit function gets very noisy, and it becomes difficult for the optimization algorithm to converge. If on the other hand the frequency of the pattern is low, then the bandwidth of the in-focus low frequency content recovered by the HiLo algorithm becomes very limited and very little low frequency information is present in the optical section. Moreover the period of the pattern has to be chosen much smaller than the size of the region of interest in the images. In practice we work with pattern periods ranging between 1 and 4  $\mu\text{m}$ . These values correspond to spatial frequencies ranging between 7% and 29% of the microscope cutoff frequency. Ideally we should have chosen to work at half the cutoff frequency, where the optical sectioning has the lowest depth of focus,<sup>14</sup> but we did not succeed to obtain a sufficiently high contrast in this configuration

when imaging deeper than  $20 \mu\text{m}$  inside the drosophila brain. The efficiency of the optimization algorithm depends on the gaussian filter width  $w$ . This width is chosen empirically, its value is close to 2% of the microscope cutoff frequency.

The optimization method is useful for correcting the unpredictable aberrations induced by the sample. Aberrations induced by the setup in the path common to the emission and the excitation, between the microscope objective and the dichroic mirror, are estimated and corrected using DM and WS in a closed-loop configuration and calibrated fluorescent beads as guide stars. The mirror shape obtained at this stage is then used as the starting shape for the optimization processes. Decoupling the compensation of the aberrations present in the optical system from the aberrations induced by the sample, greatly facilitates the efficiency of the image-based optimization algorithm by providing an initial guess. We call this initial DM shape the “best flat mirror”. This shape requires only typically 10% of the dynamic range of the DM. It must be noted however that the recording of this mirror map is not mandatory to perform the sensorless optimization. Its use allows us to start the optimization by having already corrected the setup induced aberrations. We need to record a command matrix to drive the DM. Indeed, the sensorless algorithm uses mirror deformations that match the Zernike aberrations, so it has to know how the commands sent to the DM translate to its final shape. We chose to use a WS to calculate the DM control matrix,<sup>15</sup> although this step could be done without this element.<sup>16</sup> During the course of the sensorless optimization, the WS is not used. In practice the command matrix is computed daily in order to compensate any mechanical drift of the microscope.



**Fig 2** Two different kind of optimizations on images of a dense stripe of 1  $\mu\text{m}$  green fluorescent beads embedded in an agarose gel. (a) Image with optimization based on Sobel merit factor. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . (b) Image with aberration correction based on Fourier merit factor. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . (c) Decomposition of the differential wavefront in terms of aberrations. (d) Differential wavefront for the DM shapes after Sobel and Fourier optimizations.

### 3 Characterisation and performances of the setup

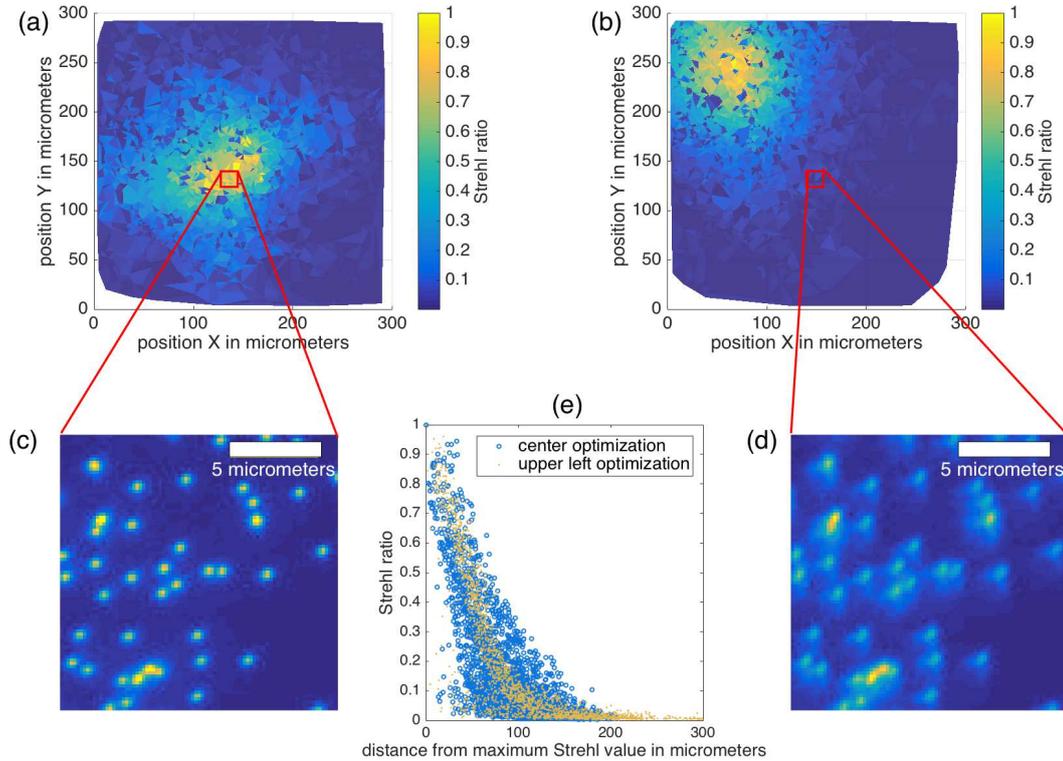
#### 3.1 Evaluation of the differential aberration in the excitation and emission paths

As we use patterned excitation in order to build optical sections, the DM mirror has to compensate simultaneously the aberrations present in the excitation path, in order to provide a good pattern contrast in the sample and in the emission path in order to recover aberration-free images. However these paths are only common between the dichroic mirror and the sample. It is relevant to ensure that no differential aberration between the emission and excitation is present. The presence of differential aberrations along the two paths would limit the dynamics of the optimization. In order to evaluate the differential aberrations between the excitation and emission paths, we imaged a

dense stripe of 1  $\mu\text{m}$  diameter green fluorescent beads deposited on a coverslip and performed two different optimization steps, one using a merit function based on the Fourier factor of merit and the second based on the Sobel factor of merit. The Fourier merit factor is mostly sensitive to aberrations present between the DMD and the camera. Optimization using this merit factor corrects full path composed of the excitation and emission paths. The Sobel merit factor is sensitive to sharp discontinuities in the image, like the edges of the bead images. Optimization based on the Sobel factor thus corrects only the emission path. If no differential aberration is present, the two optimizations should lead to the same DM shape. In Fig. 2 we show the images obtained after optimization either with Sobel merit factor (Fig. 2(a)) or with Fourier merit factor (Fig. 2(b)). By comparing the DM shapes for the two optimizations, we measured a 20 nm RMS differential aberration between excitation and emission paths (Fig. 2(c) and (d)). This value is not significant as it corresponds to the fluctuations of the merit factor. This result proves that differential aberrations do not play a significant role in the efficiency of the aberration reduction.

### 3.2 Evaluation of spatial lateral extent of correction

Some authors<sup>17</sup> have proved that placing the DM at other locations than conjugate to the exit pupil of the objective would lead to a more efficient compensation of the aberrations induced by the samples. However this is true if the axial positions of the aberrant regions are known. We do not have this *a priori* knowledge, so we decided to work in the most common configuration. This means that the wavefront we wish to correct is the average of all the wavefronts coming by all the emitting regions in the field of view. If the sample is inhomogeneous, as it is the case with drosophila brain, then the optimization loop, acting on a single DM, will not be able to compensate all the wavefront distortions throughout the whole sample. It may thus not be a clever choice to

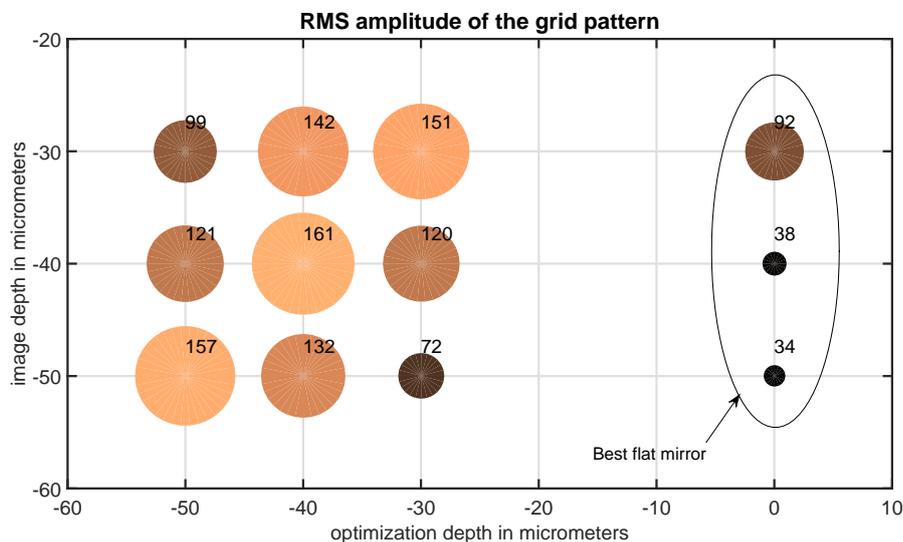


**Fig 3** Strehl ratios measurements. (a) Strehl map for an aberration correction on a bead in the center of the field of view.  $n = 2382$  beads are used for the map reconstruction. (b) Strehl map for an aberration correction on a bead in the top left-hand corner of the field of view.  $n = 2170$  beads are used for the map reconstruction. (c) Image of beads in the center of the field of view when the aberration correction is applied on a bead in the center of the field of view. Scale bar:  $5 \mu\text{m}$ . (d) Image of beads in the center of the field of view when the aberration correction is applied on a bead in the top left-hand corner of the field of view. Scale bar:  $5 \mu\text{m}$ . (e) Representation of the Strehl ratio with respect to distance to the maximum Strehl ratio value for the two different locations of correction in the field of view.

build our merit factor from the whole image, but rather use a smaller area inside of which we could suppose that the aberration content does not vary with position. This compromise will allow to recover a good quality image only in selected regions of interest, and we have to make sure that the size of these regions is at least equal to the characteristic size of the objects we wish to image. In order to obtain an estimate of the size of this surface we measured the size of the isoplanetic patch we could obtain with our setup with Strehl ratios measurements.<sup>18</sup> We deposited 200 nm diameter fluorescent beads on a coverslip and used the sensorless correction method on a single isolated bead with a Sobel merit factor. We determined the mirror shape that optimized the image

of the beads at two different locations in the field of view: at the center and at upper left hand corner of the camera field of view. We estimated the Strehl ratio of each bead of the field of view. The Strehl ratio is defined as the ratio of the peak intensity of the actual microscope point spread function (PSF) over the peak intensity of the ideal microscope Airy spot. We could not easily estimate the peak intensity of the PSF because the beads we used had diameters comparable to the Airy spot diameter, and because the image of the beads were sampled only over 4 to 9 pixels. We thus decided to estimate the Strehl ratio by measuring the size of the detected bead images and compare them with the size of simulated images of beads placed at the same locations. We first find the position of the centroid of each bead, and estimate the radii of their image  $w_{\text{bead}}$  by gaussian fit. We simulate the ideal images of the 200 nm diameter beads centered at the location of the centroids found previously and perform the same gaussian fits on these model beads. We correct all the fits by taking into account the sampling by the camera and the diameter of the beads. Finally we calculate the ratio of the calculated area of the aberration-free image of a 200 nm bead over the surface of the measured images. The Strehl map for the two mirror shapes are given in Fig. 3(a) and (b). Figure 3(c) shows beads close to the center of the corrected area and Fig. 3(d) shows beads 150  $\mu\text{m}$  away from the center of the corrected area. In both cases we obtained Strehl ratios larger than 0.6 on 100  $\mu\text{m}$  diameter discs around the fluorescent bead used as a guide star (Fig. 3(e)). The size of these isoplanetic surfaces is compatible with the characteristic size of the structures we want to observe in our samples. We conclude that if we image regions of a size comparable to the isoplanetic surface, and if the aberration content is reasonably constant within this region, then the optimization loop based on a merit function will restore the quality of the image in the region of interest.

### 3.3 Evaluation of axial extension of correction into drosophila brain



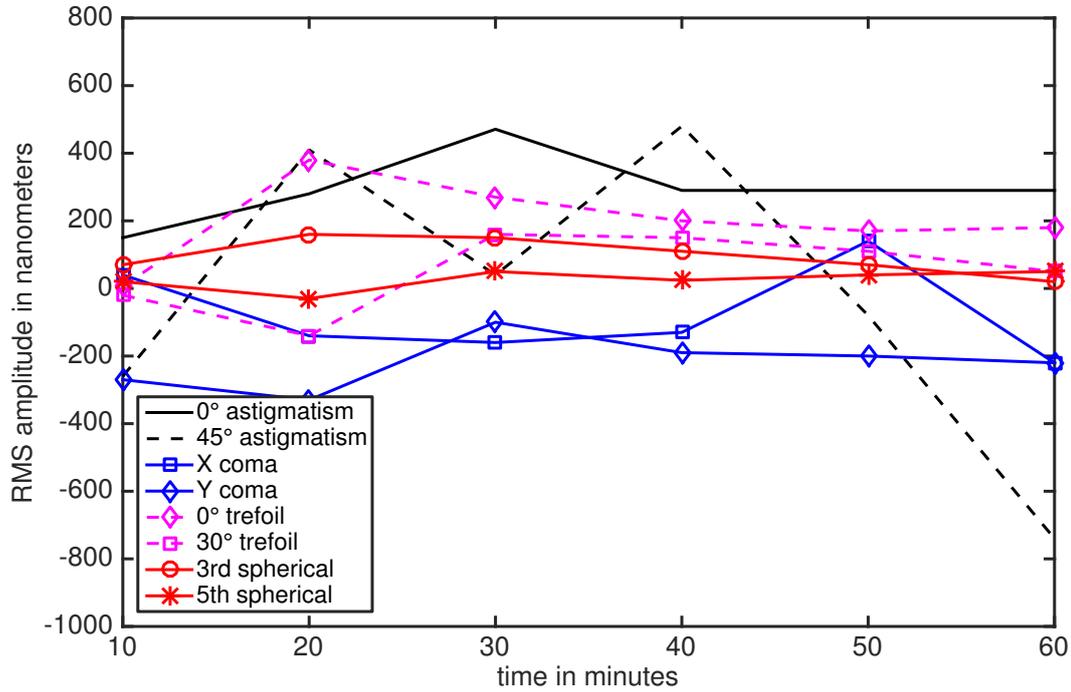
**Fig 4** Evaluation of the RMS amplitude of the grid pattern down to 50  $\mu\text{m}$  inside the brain with the best flat mirror shape and with optimized DM shapes. Three different depths were imaged inside the drosophila brain: 30, 40 and 50  $\mu\text{m}$  under the brain surface. For each of these depths, we run the optimization algorithm with the Fourier merit factor to correct aberrations. To quantify the improvement brought by the adaptive optics on the quality of the patterned illumination, we calculated the RMS amplitude of the projected grid.

The samples we wish to study being three dimensional, we have to characterize the extension of the efficiency of the aberration correction in the axial direction i.e. the one of the optical axis in our biological sample. We imaged *Drosophila melanogaster* brain *in vivo* and especially a region called the mushroom bodies known to be the memory center of the fly<sup>19</sup> (see Sect. 2.1 for details about *in vivo* fly preparation for imaging). We projected a grid pattern of 2.5  $\mu\text{m}$  period into the brain at different depths: 30, 40 and 50  $\mu\text{m}$  below the brain surface. For each of the depths, we corrected optical aberrations and improved the grid contrast by running the optimization algorithm with Fourier merit factor. We then calculated the RMS amplitude of the grid pattern in the images by calculating the standard deviation of the difference of the two normalized images (with uniform and structured illumination). The results are presented on Fig. 4 where the depth of the focal plane is shown on the ordinate, and the depth at which the optimization was performed is on the abscissa.

The best flat mirror shape corresponds to optimization at a depth of zero where optimization was performed using the WS and fluorescent beads. The RMS amplitude is given as grey levels in the image. For example, the point where the contrast level is 132 corresponds to the case where the optimization step was performed 40  $\mu\text{m}$  below the surface, but the image was recorded at 50  $\mu\text{m}$  depth. With the best flat mirror, the grid RMS amplitude decreases very rapidly with depth inside the drosophila brain. Below 30  $\mu\text{m}$  into the brain, it becomes impossible to process structured illumination microscopy without adaptive optics. With aberration correction, we were able to improve the grid contrast down to 50  $\mu\text{m}$  depth. For example, at 50  $\mu\text{m}$  deep inside the drosophila brain we got a four-fold improvement of the grid RMS amplitude when the loop is run at the same depth compared to the case where we kept the best flat mirror. The contrast obtained when the optimization is performed at the imaging depth, remains constant with increasing depth. This proves that the optimization should be able to preserve the image quality within thick samples. Comparison with the results obtained with the mirror shape optimized on the surface proves that without a depth dependant optimization it is impossible to image structures deeper than a few ten micrometers. Eventually, we observe that the grid contrast decreases by 20% if the optimization depth is 10  $\mu\text{m}$  above or below the imaging plane. We take this value of 10  $\mu\text{m}$  as a rough estimate of the thickness in which we can keep the same correction when performing 3D imaging.

### *3.4 Temporal stability of aberration correction for in vivo imaging*

Our aim being to image living samples, the temporal behavior of the wavefront correction is a key issue. Indeed, if the aberrations are fluctuating it will be necessary to run the optimization step at regular intervals. We evaluated the fluctuations of the optimized DM shape by imaging a fixed plane within the brain and running the optimization loop every ten minutes for one hour. We chose

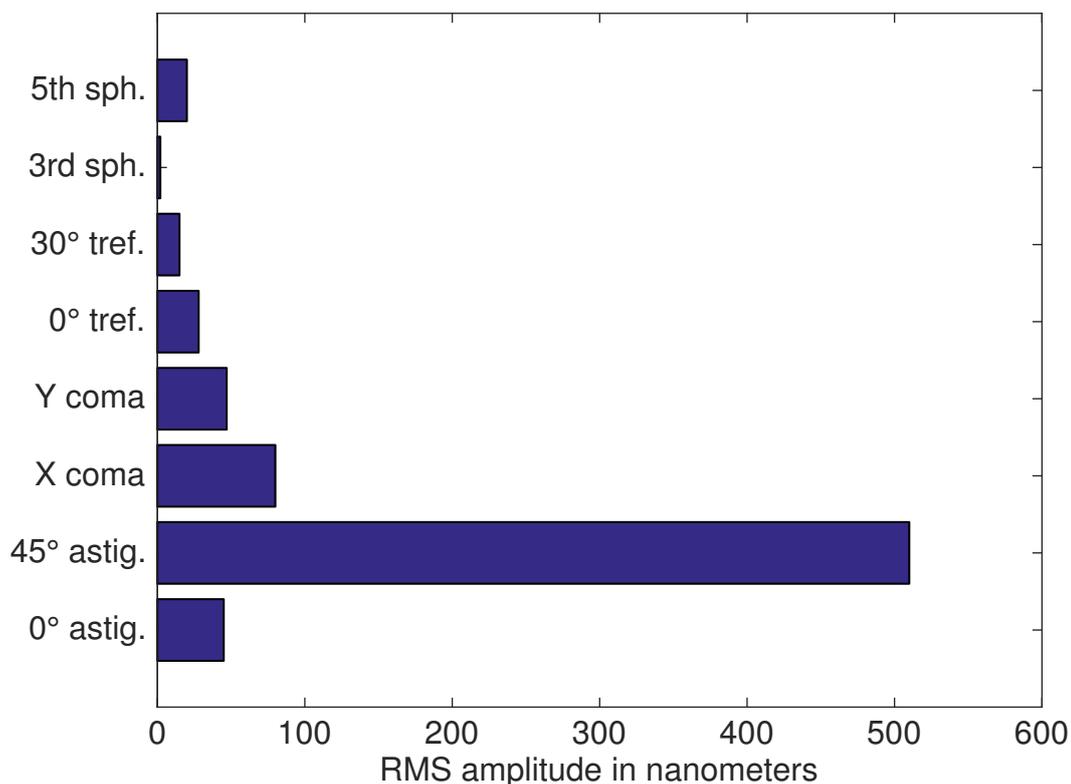


**Fig 5** Temporal evolution of RMS amplitude of third order aberrations and fifth order spherical aberration for a  $30 \mu\text{m}$  imaging depth inside living drosophila brain.

this duration because in our experimental conditions, *in vivo* imaging is only possible during about one hour. After that, possible degradation of the sample may induce morphological changes of the tissues. The result is shown in Fig. 5 in which the change of the DM shape is presented as RMS values of the corrected aberrations. These corrections do not fluctuate by more than a few hundred of nanometers. The third and fifth order spherical aberrations are particularly stable. We explain the erratic behavior of the  $45^\circ$  astigmatism, which fluctuates much more than all other aberrations, by observing that our Fourier merit factor optimizes only one particular region of the Fourier space. The effect of astigmatism on a microscope optical transfer function depends on orientation and has a moderate effect in a direction in the Fourier space.<sup>20</sup> If the region in the Fourier space, chosen for optimization and determined by the grid frequency and orientation, lies in the region where astigmatism, either at  $0^\circ$  or  $45^\circ$ , has little effect, then the merit factor is poorly sensitive to its presence. Therefore, variation of astigmatism can not be attributed to the sample evolution. These

measurements suggest that aberrations induced by the drosophila brain are static.

### 3.5 Dependence on the spatial frequency of the illumination pattern

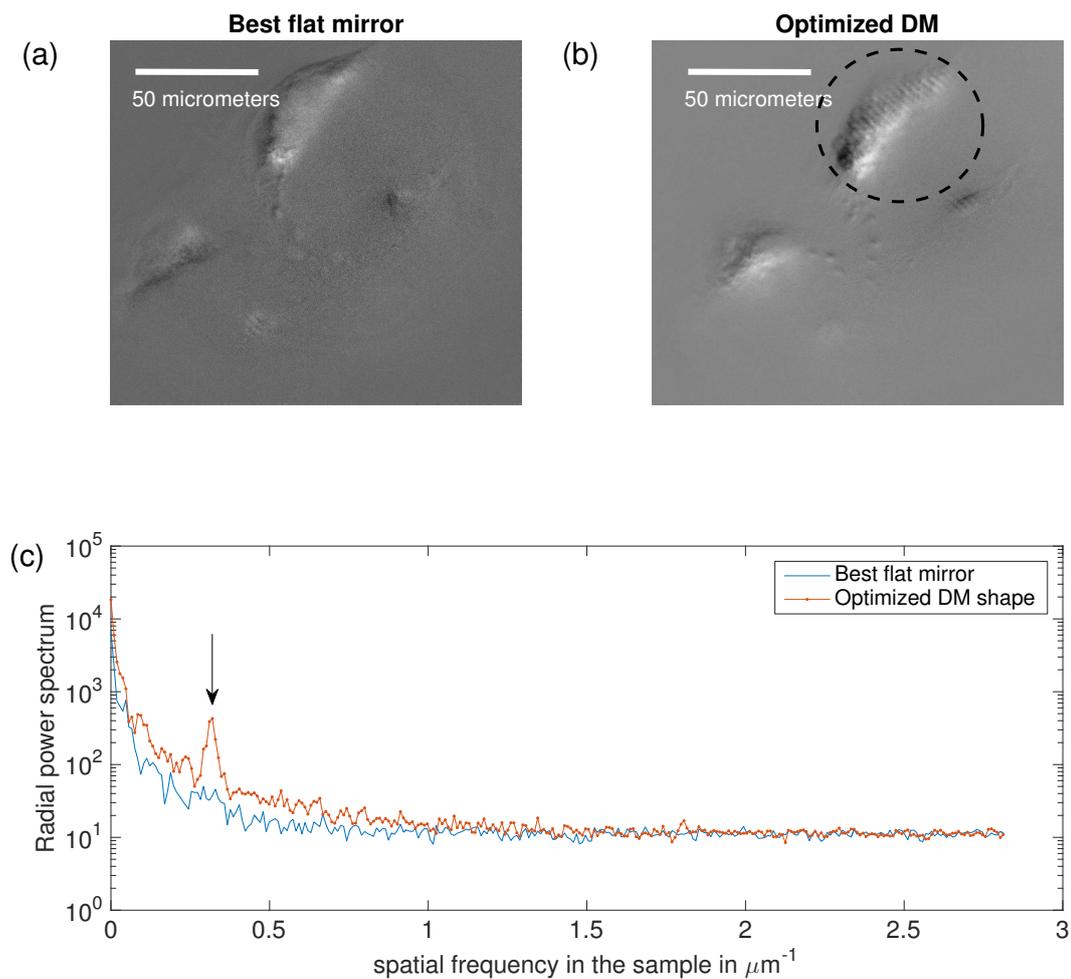


**Fig 6** Differential aberration content for optimizations with two different grid periods: 1.25 and 2.5  $\mu\text{m}$  in the sample, for a 40  $\mu\text{m}$  imaging depth inside living drosophila brain.

We tested the influence of the choice of the pattern frequency on the Fourier merit factor. We compared the results of optimizations performed at the same location in a sample, but with two different pattern periods of 1.25 and 2.5  $\mu\text{m}$ . These two frequencies of the pattern are chosen because they are well suited to Kenyon cells imaging into drosophila brain. Figure 6 shows the difference between the two DM shapes expressed as RMS difference of the optimized aberrations. Except for the 45° astigmatism, all the aberrations are corrected to less than 100 nm. Here also the pattern orientation makes the Fourier merit factor less sensitive to 45° astigmatism than to 0°

astigmatism. The correction does not depend on the choice of one or the other of the two tested frequencies.

#### 4 Biological results: HiLo imaging in depth inside *in vivo* drosophila brain



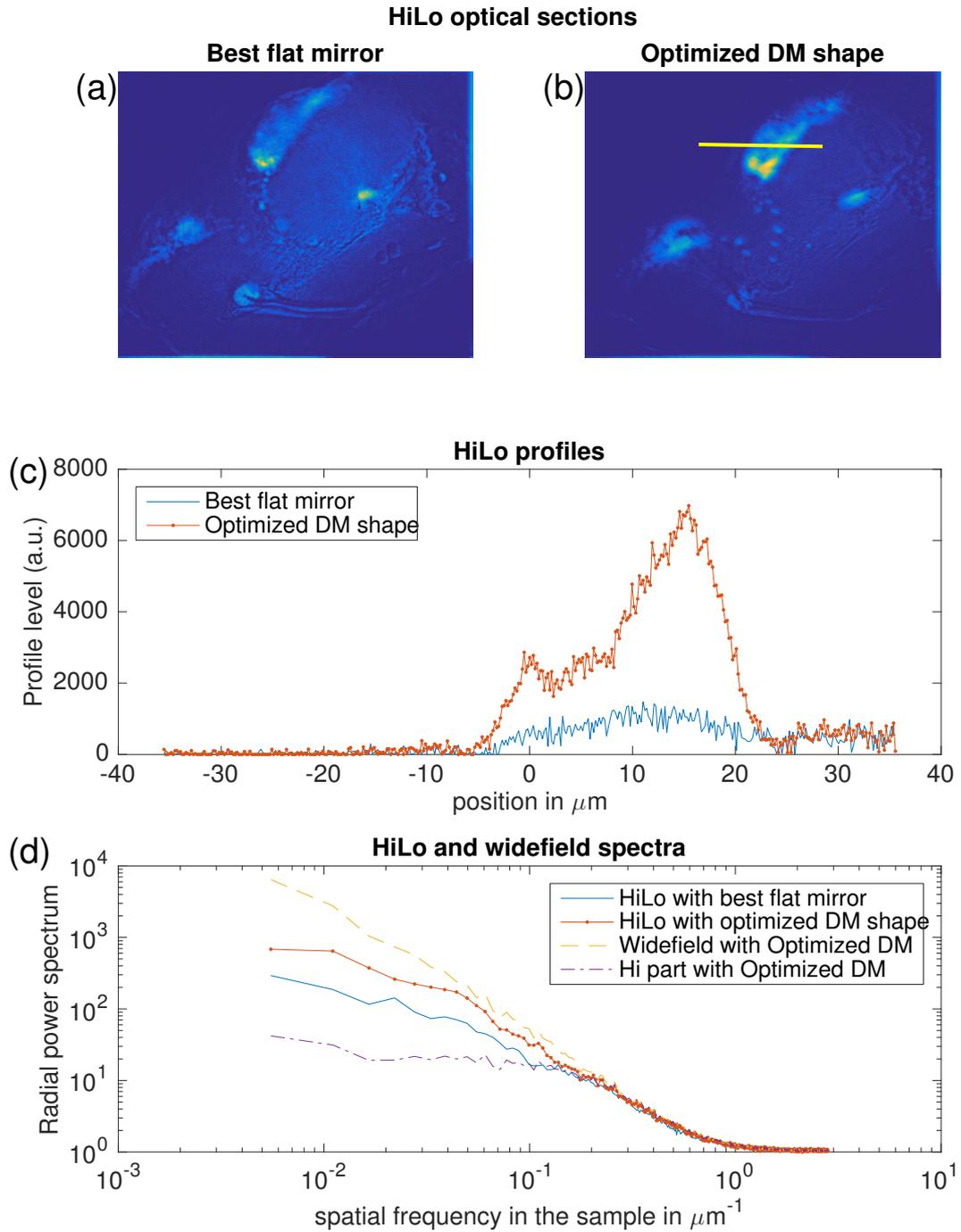
**Fig 7** (a) Processed fluorescence structured illumination image of mushroom bodies neurons obtained with the best flat mirror shape. (b) Processed fluorescence structured illumination image of mushroom bodies neurons obtained with the optimized mirror shape. Image processing consists in uniform illumination image subtraction. The encircled area corresponds to the region of interest which has been optimized. The size of the images shown in (a) et (b) is 164 by 164  $\mu\text{m}$ . (c) Radial power spectra of images shown in (a) and (b). The arrow points on the grid pattern spatial frequency.

The quality of the optical sections in structured illumination microscopy, particularly their low spatial frequency content, depends mainly on the contrast of the illumination pattern. Indeed, this

contrast is the weight of the frequency shifted spectra of the samples that are used in the HiLo algorithm. If the grid contrast is too low then the low spatial frequency content that the sectioning algorithm aims at recovering will be polluted by some high frequency content of the unmodulated spectrum. Before computing optical sections, we present the effect of our optimization method on the illumination pattern. We have reproduced the following experiments on four flies and we present the results obtained with one of them. We performed optimization based on Fourier merit factor at  $40 \mu\text{m}$  deep inside the drosophila brain tagged with GFP biosensor. Without AO, the grid quality is very poor (Fig. 7(a)) and can be improved by running the optimization algorithm taking into account all the third order aberrations and the fifth order spherical aberration (Fig. 7(b)). To emphasize the enhancement of the grid contrast with the aberration correction and make it more visible in the presented images, we decided not to present the raw images taken with structured illumination but we subtracted the uniform illumination image from the one with structured illumination. The radial power spectra, shown in Fig. 7(c), were determined by calculating the power in concentric rings into the Fourier diagram of both images acquired with the best flat mirror and the optimized mirror shapes. The peak, corresponding to the spatial frequency of our grid pattern, is only well resolvable when aberrations are corrected. This result proves once again that structured illumination microscopy can not be performed at  $40 \mu\text{m}$  inside drosophila brain without the implementation of a corrective setup. It appears that this merit factor mimics a single guide star in Fourier space. Indeed it points at a single spatial frequency  $(f_{x,\text{mod}}, f_{y,\text{mod}})$  and aims at optimizing the frequency content of the images around this frequency. It is the Fourier equivalent of having a single guide star a location  $(x_{\text{star}}, y_{\text{star}})$  in real space and optimizing the wavefront around this location. Thus it suffers the same limitation of having a limited corrected frequency range equivalent of the isoplanetic surface in real space. This effect is apparent in Fig. 7(c) where the optimization

process enhances the presence of the modulation pattern and drags the surrounding part of the spectrum. Frequencies far from the modulation frequency are less affected by the optimization.

We processed HiLo reconstruction at 40  $\mu\text{m}$  inside drosophila brain. The results are shown in Fig. 8(a) and (b). The optical sections are built by combining the high spatial frequency content of a high-pass filtered flat illumination image, and the in-focus low frequency content.<sup>2,3</sup> The in-focus low-frequency content is obtained by demodulating and low-pass filtering the patterned image. To quantify the improvement of the quality of optical sections with adaptive optics, we plotted intensity profiles through HiLo images both for best flat mirror shape and optimized mirror shape (see Fig. 8(c)). Thanks to a better grid contrast into the sample, we were able to recover in-focus low spatial frequencies. We calculated the radial power spectra for HiLo reconstruction with the best flat mirror, HiLo reconstruction with optimized mirror, flat illumination image with optimized mirror and high spatial frequency content of flat illumination image with optimized mirror shape. All these four spectra superimpose for high spatial frequencies information (see Fig. 8(d)) but the low spatial frequencies content of images vary. The comparison of the uniform illumination image spectrum and the HiLo image spectrum recorded with an optimized mirror shape clearly shows the removal of low frequency content, this part being out-of-focus. Comparison of the two HiLo image spectra recorded with optimized and flat mirror shape proves that if the optimized mirror is not used then the HiLo algorithm can not recover the in-focus low frequency content. These results demonstrate that the capability of HiLo microscopy to recover in-focus low frequency content in optical sections can be obtained at least 40  $\mu\text{m}$  deep in living tissues, but requires the use of a wavefront correction system acting on both the illumination and emission paths.



**Fig 8** HiLo imaging at  $40\ \mu\text{m}$  inside drosophila brain. (a) HiLo reconstruction with the best flat mirror shape. Image size is  $164$  by  $164\ \mu\text{m}$ . (b) HiLo reconstruction with optimized DM shape. (c) Intensity profiles of HiLo images with best flat and optimized mirror shapes. (d) Radial power spectra in spatial frequency domain for HiLo image with the best flat mirror shape, HiLo image, widefield image and Hi part with optimized DM shape. Hi part denotes high frequency content of widefield image.

## 5 Conclusion

The results presented in this paper pave the way towards dynamical studies several tens of micrometers deep inside living samples. Nevertheless degradation due to photobleaching can become a limiting factor. Thanks to the widefield optical sectioning technique that requires a low excitation illumination power, photobleaching was not observed during an optimization calculation loop (typically 0.5 second for one aberration mode with 100 ms exposure time on camera) and does not lead to variation of the merit factor used to determine the best DM shape. This optimization time and the correction quality depend on the number of aberrations which are corrected. The best compromise that we experimentally determined consists in correcting all the third order aberrations and the fifth order spherical aberration. No significant grid contrast gain could be observed with higher orders aberrations correction, while increasing optimization calculation duration and photobleaching.

We have proved that HiLo optical sections can be obtained deep inside living drosophila brains, and that the aberrations induced by the brain are static. We can thus think of ways to build stacks of optical sections throughout the whole brain. One way to build such a 3D stack at a fast pace would be to record the optimized mirror shape every 10  $\mu\text{m}$  into the brain in a first step, and then to feed the DM with these shapes to perform fast HiLo microscopy at different depths. The optimization and imaging steps being decoupled, two different markers could be used so the long optimization step would not lead to photobleaching of the markers used for HiLo microscopy.

### *Acknowledgments*

This work was supported by a grant from Région Ile-de-France (project “ImPhysBio”). We would like to thank also T. Pr at’s laboratory for providing us with biological samples and X. Levecq and

G. Clouvel from Imagine Optic company for technical helps and fruitful discussions.

### References

- 1 L. K. et al., “Continuous volumetric imaging via an optical phase-locked ultrasound lens,” *Nature Methods* **12**(8), 759–762 (2015).
- 2 J. Mertz and J. Kim, “Scanning light-sheet microscopy in the whole mouse brain with holo background rejection,” *J. Biomed. Opt.* **15**(1), 016027 (2010).
- 3 A. M. et al., “Micromirror structured illumination microscope for high-speed in vivo drosophila brain imaging,” *Opt. Express* **22**(2), 1243–1256 (2014).
- 4 M. J. Booth, “Adaptive optics in microscopy,” *Phil. Trans. R. Soc. A* **365**, 2829–2843 (2007).
- 5 M. J. Booth, “Adaptive optical microscopy: the ongoing quest for a perfect image,” *Light: Science and Applications* **3**, e165 (2014).
- 6 J. M. Girkin, S. Poland, and A. J. Wright, “Adaptive optics for deeper imaging of biological samples,” *Current Opinion in Biotechnology* **20**, 106–110 (2009).
- 7 P. V. et al., “Adaptive optics for fluorescence wide-field microscopy using spectrally independent guide star and markers,” *J. Biomed. Opt.* **16**, 076019 (2011).
- 8 O. A. et al., “Wavefront aberration measurements and corrections through thick tissue using fluorescent microsphere reference beacons,” *Opt. Express* **18**, 17521–17532 (2010).
- 9 O. A. et al., “Adaptive optics wide-field microscopy using direct wavefront sensing,” *Optics Letters* **36**(6).
- 10 D. D. et al., “Adaptive optics for structured illumination microscopy,” *Opt. Express* **16**, 9290–9305 (2008).
- 11 J. B. Duffy, “Gal4 system in drosophila: a fly geneticist’s swiss army knife,” *Genesis* **34**(1-2).



# Bibliographie

- [1] K. N. Kay, T. Naselaris, R. J. Prenger, and J. L. Gallant. Identifying natural images from human brain activity. *Nature*, 452(7185) :352–355, 2008. (Cité en page [1](#).)
- [2] J. B. Duffy. Gal4 system in drosophila : A fly geneticist’s swiss army knife. *Genesis*, 34(1-2) :1–15, 2002. (Cité en pages [2](#) et [13](#).)
- [3] J.S. de Belle and M. Heisenberg. Associative odor learning in drosophila abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science*, 263(5147) :692–695, 1994. (Cité en pages [2](#), [7](#), [12](#) et [122](#).)
- [4] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793) :1642–1645, 2006. (Cité en pages [3](#) et [36](#).)
- [5] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, and W. E. Moerner. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 388(6640) :355–358, 1997. (Cité en page [3](#).)
- [6] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15) :8206–8210, 2000. (Cité en pages [3](#) et [36](#).)
- [7] George H. Patterson and Jennifer Lippincott-Schwartz. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, 297(5588) :1873–1877, 2002. (Cité en page [3](#).)
- [8] D. Lim, K. K. Chu, and J Mertz. Wide-field fluorescence sectioning with hybrid speckle and uniform-illumination microscopy. *Optics Letters*, 33(16) :1819–1821, 2008. (Cité en pages [3](#), [46](#), [47](#) et [51](#).)
- [9] T. W. Chen, T. J. Wardill, Y. Sun, S. R. Pulver, S. L. Renninger, A. Baohan, E R. Schreiter, R. A. Kerr, M. B. Orger, V. Jayaraman, L. L. Looger, K. Svoboda, and Kim D. S. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458) :295–300, 2013. (Cité en pages [4](#) et [21](#).)
- [10] G. Cao, J. Platasa, V. A. Pieribone, D. Raccuglia, M. Kunst, and M. N. Nitabach. Genetically targeted optical electrophysiology in intact neural circuits. *Cell*, 154(4) :904 – 913, 2013. (Cité en pages [4](#), [23](#), [179](#) et [205](#).)
- [11] M. D. Adams and al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461) :2185–2195, 2000. (Cité en page [7](#).)

- [12] V. Goguel, A.-L. Belair, D. Ayaz, A. Lampin-Saint-Amaux, N. Scaplehorn, B. A. Hassan, and T. Preat. Drosophila amyloid precursor protein-like is required for long-term memory. *The Journal of Neuroscience*, 31(3) :1032–1037, 2011. (Cité en page 7.)
- [13] Alexander J. Whitworth. Drosophila Models of Parkinson’s Disease. *Advances in Genetics*, 73 :1–50, 2011. (Cité en page 7.)
- [14] S. Park, R. W. Alfa, S. M. Topper, G. E. S. Kim, L. Kockel, and S. K. Kim. A genetic strategy to measure circulating drosophila insulin reveals genes regulating insulin production and secretion. *PLOS Genetics*, 10(8) :e1004555, 2014. (Cité en page 7.)
- [15] M. E. Fortini, M. P. Skupski, M. S. Boguski, and I. K. Hariharan. A survey of human disease gene counterparts in the drosophila genome. *The Journal of Cell Biology*, 150(2) :23–30, 2000. (Cité en page 8.)
- [16] W. G. Quinn, W. A. Harris, and S. Benzer. Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(3) :708–712, 1974. (Cité en pages 9 et 145.)
- [17] A. Pascual and T. Preat. Localization of long-term memory within the drosophila mushroom body. *Science*, 294(5544) :1115–1117, 2001. (Cité en pages 10, 145 et 193.)
- [18] T. Tully, T. Preat, S. C. Boynton, and M. Del Vecchio. Genetic dissection of consolidated memory in Drosophila. *Cell*, 79(1) :35–47, 1994. (Cité en pages 10 et 145.)
- [19] Y. Dudai, Y. N. Jan, D. Byers, W. G. Quinn, and S. Benzer. *dunce*, a mutant of Drosophila deficient in learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(5) :1684–1688, 1976. (Cité en page 11.)
- [20] M. S. Livingstone, P. P. Sziber, and W. G. Quinn. Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a Drosophila learning mutant. *Cell*, 37(1) :205–215, 1984. (Cité en page 11.)
- [21] W. G. Quinn, P. P. Sziber, and R. Booker. The Drosophila memory mutant amnesiac. *Nature*, 277(5693) :212–214, 1979. (Cité en page 11.)
- [22] G. Didelot, F. Molinari, P. Tchenio, D. Comas, E. Milhiet, A. Munnich, L. Colleaux, and T. Preat. Tequila, a Neurotrypsin Ortholog, Regulates Long-Term Memory Formation in Drosophila. *Science*, 313(5788) :851–853, 2006. (Cité en page 11.)
- [23] M. Heisenberg. Mushroom body memoir : from maps to models. *Nature Reviews Neuroscience*, 4 :266–275, 2003. (Cité en page 11.)
- [24] T. Preat and G. Isabel. *Molecular and system analysis of olfactory memory in drosophila. In Learning and Memory : A Comprehensive Reference*. Elsevier. Ed J.H. Byrne, 2008. (Cité en pages 11, 58 et 191.)
- [25] D. Yu, D. B. Akalal, and R. L. Davis. Drosophila  $\alpha/\beta$  mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron*, 52(5) :845–55, 2006. (Cité en pages 12, 71 et 167.)
- [26] R. I. Wilson and G. Laurent. Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the Drosophila antennal lobe. *The Journal of neuroscience*, 25(40) :9069–9079, 2005. (Cité en pages 12, 190 et 204.)

- [27] G. C. Turner, M. Bazhenov, and G. Laurent. Olfactory representations by drosophila mushroom body neurons. *Journal of Neurophysiology*, 99(2) :734–746, 2008. (Cité en pages [12](#), [123](#), [145](#) et [157](#).)
- [28] Y. Aso, K. Grübel, S. Busch, A. B. Friedrich, I. Siwanowicz, and H. Tanimoto. The mushroom body of adult drosophila characterized by GAL4 drivers. *Journal of Neurogenetics*, 23(1-2) :156–172, 2009. (Cité en pages [16](#) et [149](#).)
- [29] S.E. McGuire, G. Roman, and al. Gene expression systems in drosophila : a synthesis of time and space. *Trends in Genetics*, 20(8) :384–391, 2004. (Cité en page [16](#).)
- [30] J. Livet, T. A. Weissman, H. Kang, R. W. Draft, J. Lu, R. A. Bennis, J. R. Sanes, and J. W. Lichtman. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 450(7166) :56–62, 2007. (Cité en page [19](#).)
- [31] S. Hampel, P. Chung, C. E. McKellar, D. Hall, L. L. Looger, and J. H. Simpson. Drosophila Brainbow : a recombinase-based fluorescence labeling technique to subdivide neural expression patterns. *Nature Methods*, 8(3) :253–259, 2011. (Cité en page [19](#).)
- [32] Gero Miesenbock, Dino A. De Angelis, and James E. Rothman. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 394(6689) :192–195, July 1998. (Cité en pages [19](#) et [24](#).)
- [33] D. Willoughby and D. M. F. Cooper. Live-cell imaging of cAMP dynamics. *Nature Methods*, 5(1) :29–36, 2008. (Cité en page [19](#).)
- [34] A. E. Palmer and R. Y. Tsien. Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nature protocols*, 1(3) :1057–1065, 2006. (Cité en page [19](#).)
- [35] S. A. S. Hires, L. Tian, and Looger L. L. Reporting neural activity with genetically encoded calcium indicators. *Brain Cell Biology*, 36(1-4) :69–86, 2008. (Cité en pages [19](#) et [205](#).)
- [36] T. Riemensperger, U. Pech, S. Dipt, and A. Fiala. Optical calcium imaging in the nervous system of drosophila melanogaster. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(8) :1169–1178, 2012. (Cité en page [19](#).)
- [37] T. Rose, P. Goltstein, R. Portugues, and O. Griesbeck. Putting a finishing touch on gecis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7(88), 2014. (Cité en page [19](#).)
- [38] K. Horikawa. Recent progress in the development of genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *The Journal of Medical Investigation*, 62(1-2) :24–28, 2015. (Cité en page [19](#).)
- [39] N. Heim and O. Griesbeck. Genetically encoded indicators of cellular calcium dynamics based on troponin C and green fluorescent protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 :14280–14286, 2004. (Cité en page [20](#).)
- [40] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645) :882–887, 1997. (Cité en page [20](#).)
- [41] G. J. Broussard, R. Liang, and L. Tian. Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7(97), 2014. (Cité en pages [20](#) et [22](#).)

- [42] J. Akerboom, J. D. V. Rivera, M. M. R. Guilbe, E. C. A. Malavé, H. H. Hernandez, L. Tian, J. S. Hires, S. A. and Marvin, L. L. Looger, and E. R. Schreiter. Crystal structures of the gcamp calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10) :6455–6464, 2009. (Cité en pages 20 et 21.)
- [43] Q. Wang, B. Shui, M. I. Kotlikoff, and H. Sonderrmann. Structural basis for calcium sensing by GCaMP2. *Structure*, 16(12) :1817–1827, 2008. (Cité en page 21.)
- [44] J. Nakai, M. Ohkura, and K. Imoto. A high signal-to-noise  $\text{Ca}^{2+}$  probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 19(2) :137–141, 2001. (Cité en page 21.)
- [45] T.A. Pologruto, R. Yasuda, and K. Svoboda. Monitoring neural activity and  $\text{Ca}^{2+}$  with genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators. *The Journal of neuroscience*, 24(43) :9572–9579, 2004. (Cité en pages 21 et 204.)
- [46] M. Ohkura, M. Matsuzaki, H. Kasai, K. Imoto, and J. Nakai. Genetically Encoded Bright  $\text{Ca}^{2+}$  Probe Applicable for Dynamic  $\text{Ca}^{2+}$  Imaging of Dendritic Spines. *Analytical Chemistry*, 77(18) :5861–5869, 2005. (Cité en page 21.)
- [47] Y. N. Tallini, M. Ohkura, B.-R. R. Choi, G. Ji, K. Imoto, R. Doran, J. Lee, P. Plan, J. Wilson, H.-B. B. Xin, A. Sanbe, J. Gulick, J. Mathai, J. Robbins, G. Salama, J. Nakai, and M. I. Kotlikoff. Imaging cellular signals in the heart in vivo : Cardiac expression of the high-signal  $\text{Ca}^{2+}$  indicator GCaMP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12) :4753–4758, 2006. (Cité en page 21.)
- [48] D. F. Reiff, A. Ihring, G. Guerrero, E. Y. Isacoff, M. Joesch, J. Nakai, and A. Borst. In vivo performance of genetically encoded indicators of neural activity in flies. *The Journal of Neuroscience*, 25 :4766–4778, 2005. (Cité en pages 21 et 204.)
- [49] L. Tian, S. A. Hires, T. Mao, D. Huber, M. E. Chiappe, S. H. Chalasani, L. Petreanu, J. Akerboom, S. A. McKinney, E. R. Schreiter, C. I. Bargmann, V. Jayaraman, K. Svoboda, and L. L. Looger. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved G-CaMP calcium indicators. *Nature Methods*, 6(12) :875–881, 2009. (Cité en pages 21 et 24.)
- [50] . Akerboom and al. Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging. *The Journal of Neuroscience*, 32(40) :13819–13840, 2012. (Cité en page 21.)
- [51] K. S. Honegger, R. A. Campbell, and G. C. Turner. Cellular-resolution population imaging reveals robust sparse coding in the Drosophila mushroom body. *The Journal of neuroscience*, 31(33) :11772–11785, 2011. (Cité en pages 21, 157 et 204.)
- [52] R. A. A. Campbell, K. S. Honegger, H. Qin, W. Li, E. Demir, and G. C. Turner. Imaging a population code for odor identity in the drosophila mushroom body. *The Journal of Neuroscience*, 33(25) :10568–10581, 2013. (Cité en pages 21 et 157.)
- [53] Y. Zhao, S. Araki, J. Wu, T. Teramoto, Y.-F. Chang, M. Nakano, A. S. Abdelfattah, M. Fujiwara, T. Ishihara, T. Nagai, and R. E. Campbell. An expanded palette of genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators. *Science*, 333(6051) :1888–1891, 2011. (Cité en page 21.)

- [54] M. Ohkura, T. Sasaki, C. Kobayashi, Y. Ikegaya, and J. Nakai. An improved genetically encoded red fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator for detecting optically evoked action potentials. *PLoS ONE*, 7(7) :e39933+, 2012. (Cité en page [21](#).)
- [55] S. Berlin, E. C. Carroll, Z. L. Newman, H. O. Okada, C. M. Quinn, B. Kallman, N. C. Rockwell, S. S. Martin, J. C. Lagarias, and E. Y. Isacoff. Photoactivatable genetically encoded calcium indicators for targeted neuronal imaging. *Nature Methods*, 12(9) :852–858, 2015. (Cité en page [21](#).)
- [56] L. B. Cohen, B. M. Salzberg, H. V. Davila, W. N. Ross, D. Landowne, A. S. Waggoner, and C. H. Wang. Changes in axon fluorescence during activity : molecular probes of membrane potential. *The Journal of Membrane Biology*, 19(1) :1–36, 1974. (Cité en page [22](#).)
- [57] S. Antic, G. Major, and D. Zecevic. Fast optical recordings of membrane potential changes from dendrites of pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 82(3) :1615–1621, 1999. (Cité en page [22](#).)
- [58] R. Sakai, V. Repunte-Canonigo, C. D. Raj, and T. Knöpfel. Design and characterization of a DNA-encoded, voltage-sensitive fluorescent protein. *European Journal of Neuroscience*, 13(12) :2314–2318, 2001. (Cité en page [22](#).)
- [59] K. Ataka and V. A. Pieribone. A genetically targetable fluorescent probe of channel gating with rapid kinetics. *Biophysical Journal*, 82(1) :509–516, 2002. (Cité en page [22](#).)
- [60] T. Knöpfel, J. Díez-García, and W. Akemann. Optical probing of neuronal circuit dynamics : genetically encoded versus classical fluorescent sensors. *Trends in Neurosciences*, 29(3) :160–166, 2006. (Cité en page [23](#).)
- [61] B.J. Baker, H. Mutoh, D. Dimitrov, W. Akemann, A. Perron, Y. Iwamoto, L. Jin, L.B. Cohen, E.Y. Isacoff, V.A. Pieribone, T. Hughes, and T. Knöpfel. Genetically encoded fluorescent sensors of membrane potential. *Brain Cell Biology*, 36(1-4) :53–67, 2008. (Cité en page [23](#).)
- [62] H. Mutoh, A. Perron, W. Akemann, Y. Iwamoto, and T. Knöpfel. Optogenetic monitoring of membrane potentials. *Experimental Physiology*, 96(1) :13–18, 2011. (Cité en page [23](#).)
- [63] W. Akemann, A. Lundby, H. Mutoh, and T. Knöpfel. Effect of voltage sensitive fluorescent proteins on neuronal excitability. *Biophysical Journal*, 96(10) :3959–3976, 2009. (Cité en page [23](#).)
- [64] H. H. Piao, D. Rajakumar, B. E. Kang, E. H. Kim, and Baker B. J. Combinatorial mutagenesis of the voltage-sensing domain enables the optical resolution of action potentials firing at 60 Hz by a genetically encoded fluorescent sensor of membrane potential. *The Journal of Neuroscience*, 35(1) :372–385, 2015. (Cité en page [23](#).)
- [65] L. Jin, Z. Han, J. Platisa, J. R. A. Woollorton, L. B. Cohen, and V. A. Pieribone. Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe. *Neuron*, 75(5) :779–z85, 2012. (Cité en pages [23](#), [181](#) et [200](#).)
- [66] Z. Han, L. Jin, F. Chen, J. J. Loturco, L. B. Cohen, A. Bondar, and V. A. Lazar, J. AND Pieribone. Mechanistic studies of the genetically encoded fluorescent protein voltage probe arlight. *PLoS ONE*, 9(11) :e113873, 2014. (Cité en page [23](#).)

- [67] M. T. Hasan, R. W. Friedrich, T. Euler, M. E. Larkum, G. Giese, M. Both, J. Duebel, J. Waters, H. Bujard, O. Griesbeck, R. Y. Tsien, T. Nagai, A. Miyawaki, and W. Denk. Functional fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator proteins in transgenic mice under TET control. *PLoS Biology*, 2(6) :e163+, 2004. (Cité en page 24.)
- [68] K. S. Kindt, K. B. Quast, A. C. Giles, S. De, D. Hendrey, I. Nicastro, C. H. Rankin, and W. R. Schafer. Dopamine mediates context-dependent modulation of sensory plasticity in *C. Elegans*. *Neuron*, 55 :662–676, 2007. (Cité en page 24.)
- [69] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, and T. Nann. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods*, 5(9) :763–775, 2008. (Cité en page 25.)
- [70] M. A. Walling, J. A. Novak, and J. R. E. Shepard. Quantum dots for live cell and in vivo imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(2) :441–491, 2009. (Cité en page 25.)
- [71] A. G. Barata and T. P. Dick. Chapter 4 - In vivo imaging of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in drosophila. In E. Cadenas and L. Packer, editors, *Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, Part A*, volume 526 of *Methods in Enzymology*, pages 61–82. Academic Press, 2013. (Cité en page 26.)
- [72] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, and E. Bamberg. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24) :13940–13945, 2003. (Cité en page 26.)
- [73] T. Ishii, K. Sato, T. Kakumoto, S. Miura, K. Touhara, S. Takeuchi, and T. Nakata. Light generation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals by a genetically encoded protein BACCS. *Nature Communications*, 6, 2015. (Cité en page 27.)
- [74] C. Schroll, T. Riemensperger, and al. Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in drosophila larvae. *Current Biology*, 16(17) :1741–1747, 2006. (Cité en page 27.)
- [75] J. Y. Lin, P. M. Knutsen, A. Muller, D. Kleinfeld, and R. Y. Tsien. ReaChR : a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nature Neuroscience*, 16(10) :1499–1508, 2013. (Cité en page 28.)
- [76] H. K. Inagaki, Y. Jung, E.D. Hoopfer, A. M. Wong, N. Mishra, Jo. Y. Lin, R. Y. Tsien, and D.J. Anderson. Optogenetic control of *Drosophila* using a red-shifted channelrhodopsin reveals experience-dependent influences on courtship. *Nature methods*, 11(3) :325–332, 2014. (Cité en page 28.)
- [77] A. S. Chuong, M. L. Miri, V. Busskamp, G. A. C. Matthews, L. C. Acker, A. T. Sorensen, A. Young, N. C. Klapoetke, M. A. Henninger, S. B. Kodandaramaiah, M. Ogawa, S. B. Ramanlal, R. C. Bandler, B. D. Allen, C. R. Forest, B. Y. Chow, X. Han, Y. Lin, K. M. Tye, B. Roska, J. A. Cardin, and E. S. Boyden. Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. *Nature Neuroscience*, 17(8) :1123–1129, 2014. (Cité en page 28.)

- [78] N. Fukuda, T. Matsuda, and T. Nagai. Optical control of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in a live specimen with a genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing molecular tool. *ACS Chemical Biology*, 9(5) :1197–1203, 2014. (Cité en page 28.)
- [79] T. Kitamoto. Conditional modification of behavior in drosophila by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *Journal of Neurobiology*, 47(2) :81–92, 2001. (Cité en page 28.)
- [80] M. Rosenzweig, K. M. Brennan, T. D. Tayler, P. O. Phelps, A. Patapoutian, and P. A. Garrity. The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes and Development*, 19(4) :419–424, 2005. (Cité en page 28.)
- [81] D. E. Bath, J. R. Stowers, D. Hörmann, A. Poehlmann, B. J. Dickson, and A. D. Straw. FlyMAD : rapid thermogenetic control of neuronal activity in freely walking *Drosophila*. *Nature Methods*, 11(7) :759–762, 2014. (Cité en page 28.)
- [82] A. Fiala and T. Spall. In vivo calcium imaging of brain activity in *drosophila* by transgenicameleon expression. *Sciences STKE signal transduction knowledge environment*, 2003(174) :PL6, 2003. (Cité en page 30.)
- [83] V. Jayaraman and G. Laurent. Evaluating a genetically encoded optical sensor of neural activity using electrophysiology in intact adult fruit flies. *Frontiers in Neural Circuits*, 1 :1–9, 2007. (Cité en pages 30 et 204.)
- [84] S. Sinha, L. Liang, E. T. W. Ho, K. E. Urbanek, L. Luo, T. M. Baer, and M. J. Schnitzer. High-speed laser microsurgery of alert fruit flies for fluorescence imaging of neural activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46) :18374–18379, 2013. (Cité en page 30.)
- [85] A. Masson, M. Pedrazzani, S. Benrezzak, P. Tchenio, T. Preat, and D. Nutarelli. Micromirror structured illumination microscope for high-speed in vivo *drosophila* brain imaging. *Optics Express*, 22(2) :1243–1256, 2014. (Cité en page 43.)
- [86] U. V. Nägerl, K. I. Willig, B. Hein, S. W. Hell, and T. Bonhoeffer. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(48) :18982–18987, 2008. (Cité en page 36.)
- [87] W. Wallace, L. H. Schaefer, and J. R. Swedlow. A workingperson’s guide to deconvolution in light microscopy. *BioTechniques*, 31(5) :1076–1078, 2001. (Cité en pages 38 et 161.)
- [88] T. Wilson and S. J. Hewlett. Imaging in scanning microscopes with slit-shaped detectors. *Journal of Microscopy*, 160(2) :115–139, 1990. (Cité en page 38.)
- [89] V. Bansal, S. Patel, and P. Saggau. High-speed addressable confocal microscopy for functional imaging of cellular activity. *Journal of Biomedical Optics*, 11(3) :034003+, 2006. (Cité en pages 38 et 123.)
- [90] L. Kong, J. Tang, J. P. Little, Y. Yu, T. Lämmermann, C. P. Lin, R. N. Germain, and M. Cui. Continuous volumetric imaging via an optical phase-locked ultrasound lens. *Nature Methods*, 12(8) :759–762, 2015. (Cité en page 38.)
- [91] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, 1990. (Cité en pages 40 et 89.)

- [92] M. Drobizhev, N. S. Makarov, S. E. Tillo, T. E. Hughes, and A. Rebane. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nature Methods*, 8(5) :393–399, 2011. (Cité en page 41.)
- [93] H. Kawano, T. Kogure, Y. Abe, H. Mizuno, and A. Miyawaki. Two-photon dual-color imaging using fluorescent proteins. *Nature Methods*, 5(5) :373–374, 2008. (Cité en page 41.)
- [94] F. Helmchen and W. Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, 2(12) :932–940, 2005. (Cité en page 41.)
- [95] J. Huisken and D. Y. Stainier. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*, 136(12) :1963–1975, 2009. (Cité en page 42.)
- [96] M. Mickoleit, B. Schmid, M. Weber, F. O. Fahrbach, S. Hombach, S. Reischauer, and J. Huisken. High-resolution reconstruction of the beating zebrafish heart. *Nature methods*, 11(9) :919–922, 2014. (Cité en page 42.)
- [97] I. Costantini, J.-P. P. Ghobril, A. P.P. Di Giovanna, A. L. A. L. Mascaro, L. Silvestri, M. C. C. Müllenbroich, L. Onofri, V. Conti, F. Vanzi, L. Sacconi, R. Guerrini, H. Markram, G. Iannello, and F. S. S. Pavone. A versatile clearing agent for multi-modal brain imaging. *Scientific reports*, 5(9808), 2015. (Cité en page 42.)
- [98] C. Dunsby. Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy. *Optics Express*, 16(25) :20306–20316, 2008. (Cité en page 42.)
- [99] M. A. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Optics Letters*, 22(24) :1905–1907, 1997. (Cité en pages 42, 45, 50, 75, 77 et 78.)
- [100] L. H. Schaefer, D. Schuster, and J. Schaffer. Structured illumination microscopy : artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach. *Journal of Microscopy*, 216(2) :165–174, 2004. (Cité en page 46.)
- [101] S. Santos, K. K. Chu, D. Lim, N. Bozinovic, T. N. Ford, C. Hourtoule, A. C. Bartoo, S. K. Singh, and J. Mertz. Optically sectioned fluorescence endomicroscopy with hybrid-illumination imaging through a flexible fiber bundle. *Journal of Biomedical Optics*, 14(3) :030502, 2009. (Cité en pages 46, 47 et 53.)
- [102] D. Lim, T. N. Ford, K. K. Chu, and J. Mertz. Optically sectioned in vivo imaging with speckle illumination HiLo microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 16(1) :016014, 2011. (Cité en pages 46 et 47.)
- [103] T. N. Ford, D. Lim, and J. Mertz. Fast optically sectioned fluorescence hilo endomicroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 17(2) :021105, 2012. (Cité en page 46.)
- [104] J. W. Goodman. *Introduction To Fourier Optics, Third Edition*. McGraw-Hill International Editions, 2005. (Cité en pages 47 et 64.)
- [105] J. Mertz and J. Kim. Scanning light-sheet microscopy in the whole mouse brain with hilo background rejection. *Journal of Biomedical Optics*, 15(1) :0160271–0160277, 2010. (Cité en page 51.)
- [106] Q. S. Hanley, P. J. Verveer, M. J. Gemkow, D. Arndt-Jovin, and T. M. Jovin. An optical sectioning programmable array microscope implemented with a digital micromirror device. *Journal of Microscopy*, 196(3) :317–331, 1999. (Cité en page 58.)

- [107] F. Martial and N. A. Hartell. Programmable illumination and high-speed, multi-wavelength, confocal microscopy using a digital micromirror. *PLoS ONE*, 7(8) :e43942, 2012. (Cité en page 58.)
- [108] S. Tsuda, M. Z. Kee, C. Cunha, J. Kim, P. Yan, L. M. Loew, and G. J. Augustine. Probing the function of neuronal populations : Combining micromirror-based optogenetic photostimulation with voltage-sensitive dye imaging. *Neuroscience research*, 75(1) :76–81, 2012. (Cité en page 58.)
- [109] S. Sakai, K. Ueno, T. Ishizuka, and H. Yawo. Parallel and patterned optogenetic manipulation of neurons in the brain slice using a dmd-based projector. *Neuroscience Research*, 75(1) :59–64, 2013. (Cité en page 58.)
- [110] F. B. Shipley, C. M. Clark, M. J. Alkema, and A. M. Leifer. Simultaneous optogenetic manipulation and calcium imaging in freely moving *C. Elegans*. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(28), 2014. (Cité en page 58.)
- [111] S. Bovetti and T. Fellin. Optical dissection of brain circuits with patterned illumination through the phase modulation of light. *Journal of Neuroscience Methods*, 241 :66–77, 2015. (Cité en page 58.)
- [112] Rimantas Juskaitis. Measuring the real point spread function of high numerical aperture microscope objective lenses. In James B. Pawley, editor, *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, pages 239–250. Springer US, Boston, MA, 2006. (Cité en pages 61 et 87.)
- [113] B. Zhang, J. Zerubia, and J.-C. Olivo-Marin. Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models. *Applied Optics*, 46(10) :1819–1829, 2007. (Cité en page 62.)
- [114] T. Wilson and R. Juskaitis. The axial response of confocal microscopes with high numerical aperture objective lenses. *Bioimaging*, 3(1) :35–38, 1995. (Cité en page 63.)
- [115] P. A. Stokseth. Properties of a defocused optical system. *Journal of the Optical Society of America*, 59(10) :1314–1321, 1969. (Cité en page 66.)
- [116] F. Christiansen, C. Zube, T. F. M. Andlauer, C. Wichmann, W. Fouquet, D. Oswald, S. Mertel, F. Leiss, G. Tivosanis, A. J. Farca Luna, A. Fiala, and S. J. Sigrist. Presynapses in kenyon cell dendrites in the mushroom body calyx of drosophila. *The Journal of Neuroscience*, 31(26) :9696–9707, 2011. (Cité en page 71.)
- [117] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, 198(2) :82–87, 2000. (Cité en page 75.)
- [118] M. Shaw, L. Zajiczek, and K. OHolleran. High speed structured illumination microscopy in optically thick samples. *Methods*, 2023(15), 2015. (Cité en page 75.)
- [119] M. Gustafsson. Extended-resolution reconstruction of structured illumination microscopy data. In *Adaptive Optics : Analysis and Methods/Computational Optical Sensing and Imaging/Information Photonics/Signal Recovery and Synthesis Topical Meetings on CD-ROM*, page JMA2. Optical Society of America, 2005. (Cité en page 76.)
- [120] D. Karadagli and T. Wilson. Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy. *Micron*, 39(7) :808–818, 2008. (Cité en pages 67, 77 et 97.)

- [121] H.-U. Dodt, U. Leischner, A. Schierloh, N. Jahrling, C. P. Mauch, K. Deininger, J. M. Deussing, M. Eder, W. Zieglgansberger, and K. Becker. Ultramicroscopy : three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature Methods*, 4(4) :331–336, 2007. (Cité en page 80.)
- [122] K. Chung, J. Wallace, S.-Y. Kim, S. Kalyanasundaram, A. S. Andalman, T. J. Davidson, J. J. Mirzabekov, K. A. Zalocusky, J. Mattis, A. K. Denisin, S. Pak, H. Bernstein, C. Ramakrishnan, L. Grosenick, V. Gradinaru, and K. Deisseroth. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 497(7449) :332–337, 2013. (Cité en page 80.)
- [123] H. Choi, E. Y. Yew, B. Hallacoglu, S. Fantini, C. J. Sheppard, and P. T. So. Improvement of axial resolution and contrast in temporally focused widefield two-photon microscopy with structured light illumination. *Biomedical Optics Express*, 4(7) :995–1005, 2013. (Cité en page 81.)
- [124] L.-C. Cheng, C.-H. Lien, Y. Da Sie, Y. Y. Hu, C.-Y. Lin, F.-C. Chien, C. Xu, C. Y. Dong, and S.-J. Chen. Nonlinear structured-illumination enhanced temporal focusing multiphoton excitation microscopy with a digital micromirror device. *Biomedical optics express*, 5(8) :2526–2536, 2014. (Cité en page 81.)
- [125] P. W. Winter, A. G. York, D. D. Nogare, M. Ingaramo, R. Christensen, A. Chitnis, G. H. Patterson, and H. Shroff. Two-photon instant structured illumination microscopy improves the depth penetration of super-resolution imaging in thick scattering samples. *Optica*, 1(3) :181–191, 2014. (Cité en page 81.)
- [126] P. W. Winter, P. Chandris, R. S. Fischer, Y. Wu, C. M. Waterman, and H. Shroff. Incoherent structured illumination improves optical sectioning and contrast in multiphoton super-resolution microscopy. *Optics Express*, 23(4) :5327–5334, 2015. (Cité en page 81.)
- [127] E. Y. S. Yew, H. Choi, D. Kim, and P. T. C. So. Wide-field two-photon microscopy with temporal focusing and hilo background rejection. *Proc. SPIE*, 7903 :790310, 2011. (Cité en page 81.)
- [128] S. Waddell. Dopamine reveals neural circuit mechanisms of fly memory. *Trends in Neurosciences*, 33(10) :457–464, 2010. (Cité en page 85.)
- [129] J. W. Hardy. *Adaptive Optics for Astronomical Telescopes*. Oxford University Press, July 1998. (Cité en page 86.)
- [130] F. Roddier. *Adaptive optics in astronomy*. Adaptive Optics in Astronomy, 1999. (Cité en page 86.)
- [131] R. K. Tyson. *Principles of adaptive optics*. Series in optics and optoelectronics. CRC Press, Boca Raton, FL, third edition, September 2010. (Cité en page 86.)
- [132] F. Zernike. Beugungstheorie des schneidenverfahrens und seiner verbesserten form, der phasenkontrastmethode. *Physica*, 1(7) :689–704, 1934. (Cité en page 87.)
- [133] C. J. Sheppard and M. Gu. Aberration compensation in confocal microscopy. *Applied Optics*, 30(25) :3563–3568, 1991. (Cité en page 87.)
- [134] S. Hell, G. Reiner, C. Cremer, and E. H. K. Stelzer. Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. *Journal of Microscopy*, 169(3) :391–405, 1993. (Cité en page 89.)

- [135] C. J. R. Sheppard and P. Török. Effects of specimen refractive index on confocal imaging. *Journal of Microscopy*, 185(3) :366–374, 1997. (Cité en page 89.)
- [136] M. J. Booth, M. A. A. Neil, and T. Wilson. Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media. *Journal of Microscopy*, 192(2) :90–98, 1998. (Cité en page 89.)
- [137] M. J. Booth and T. Wilson. Refractive-index-mismatch induced aberrations in single-photon and two-photon microscopy and the use of aberration correction. *Journal of Biomedical Optics*, 6(3) :266–272, 2001. (Cité en page 89.)
- [138] A. Diaspro, F. Federici, and M. Robello. Influence of refractive-index mismatch in high-resolution three-dimensional confocal microscopy. *Applied Optics*, 41(4) :685–690, 2002. (Cité en page 89.)
- [139] D. Débarre, E. J. Botcherby, T. Watanabe, S. Srinivas, M. J. Booth, and T. Wilson. Image-based adaptive optics for two-photon microscopy. *Optics Letters*, 34(16) :2495–2497, 2009. (Cité en pages 89, 94 et 113.)
- [140] R. V. Shack and B. C. Platt. Production and Use of a Lenticular Hartmann Screen. In Dow S. Chairman, editor, *Spring Meeting of the Optical Society of America*. Optical Society of America, Optical Society of America, April 1971. (Cité en page 89.)
- [141] F. Vargas-Martin, P. M. Prieto, and P. Artal. Correction of the aberrations in the human eye with a liquid-crystal spatial light modulator : limits to performance. *Journal of the Optical Society of America A*, 15(9) :2552–2562, 1998. (Cité en page 91.)
- [142] M. J. Booth, M. A. A. Neil, R. Juškaitis, and T. Wilson. Adaptive aberration correction in a confocal microscope. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9) :5788–5792, 2002. (Cité en pages 91 et 94.)
- [143] L. Sherman, J. Y. Ye, O. Albert, and T. B. Norris. Adaptive correction of depth-induced aberrations in multiphoton scanning microscopy using a deformable mirror. *Journal of Microscopy*, 206(1) :65–71, 2002. (Cité en pages 91, 94, 113 et 115.)
- [144] P. Marsh, D. Burns, and J. Girkin. Practical implementation of adaptive optics in multiphoton microscopy. *Optics express*, 11(10) :1123–1130, 2003. (Cité en pages 91, 94 et 113.)
- [145] A. J. Wright, D. Burns, B. A. Patterson, S. P. Poland, G. J. Valentine, and J. M. Girkin. Exploration of the optimisation algorithms used in the implementation of adaptive optics in confocal and multiphoton microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 67(1) :36–44, 2005. (Cité en page 91.)
- [146] E. J. Fernandez, L. Vabre, B. Hermann, A. Unterhuber, B. Povazay, and W. Drexler. Adaptive optics with a magnetic deformable mirror : applications in the human eye. *Optics Express*, 14(20) :8900–8917, 2006. (Cité en page 92.)
- [147] L. Vabre, E. J. Fernandez, F. Harms, J. Charton, B. Hermann, A. Unterhuber, B. Povazay, N. Chateau, and W. Drexler. Electromagnetic Deformable Mirror : Experimental Assessment and First Ophthalmic Applications. In C. Dainty, editor, *Adaptive Optics for Industry and Medicine*, pages 354–358, January 2008. (Cité en page 92.)

- [148] F. Marc, H. Guillet De Chatellus, and J. P. Pique. Effects of laser beam propagation and saturation on the spatial shape of sodium laser guide stars. *Optics Express*, 17(7) :4920–31, 2009. (Cité en page 92.)
- [149] L. Gilles and B. L. Ellerbroek. Shack-Hartmann wavefront sensing with elongated sodium laser beacons : centroiding versus matched filtering. *Applied Optics*, 45(25) :6568–6576, 2006. (Cité en page 92.)
- [150] O. Lardiere, R. Conan, C. Bradley, K. Jackson, and G. Herriot. A laser guide star wavefront sensor bench demonstrator for tmt. *Optics Express*, 16(8) :5527–5543, 2008. (Cité en page 92.)
- [151] X. Tao, B. Fernandez, O. Azucena, M. Fu, D. Garcia, Y. Zuo, D. C. Chen, and J. Kubby. Adaptive optics confocal microscopy using direct wavefront sensing. *Optics Letters*, 36(7) :1062–1064, 2011. (Cité en page 93.)
- [152] X. Tao, J. Crest, S. Kotadia, O. Azucena, D. C. Chen, W. Sullivan, and J. Kubby. Live imaging using adaptive optics with fluorescent protein guide-stars. *Optics Express*, 20(14) :15969–15982, 2012. (Cité en page 93.)
- [153] X. Tao, O. Azucena, M. Fu, Y. Zuo, D. C. Chen, and J. Kubby. Adaptive optics microscopy with direct wavefront sensing using fluorescent protein guide stars. *Optics Letters*, 36(17) :3389–3391, 2011. (Cité en page 93.)
- [154] R. Aviles-Espinosa, J. Andilla, R. Porcar-Guezenc, O. E. Olarte, M. Nieto, X. Levecq, D. Artigas, and P. Loza-Alvarez. Measurement and correction of in vivo sample aberrations employing a nonlinear guide-star in two-photon excited fluorescence microscopy. *Biomedical Optics Express*, 2(11) :3135–3149, 2011. (Cité en page 93.)
- [155] X. Tao, A. Norton, M. Kissel, O. Azucena, and J. Kubby. Adaptive optical two-photon microscopy using autofluorescent guide stars. *Optics Letters*, 38(23) :5075–5078, 2013. (Cité en page 93.)
- [156] O. Azucena, J. Crest, J. Cao, W. Sullivan, P. Kner, D. Gavel, D. Dillon, S. Olivier, and J. Kubby. Wavefront aberration measurements and corrections through thick tissue using fluorescent microsphere reference beacons. *Optics Express*, 18(16) :17521–17532, 2010. (Cité en page 94.)
- [157] P. Vermeulen, E. Muro, T. Pons, V. Loriette, and A. Fragola. Adaptive optics for fluorescence wide-field microscopy using spectrally independent guide star and markers. *Journal of Biomedical Optics*, 16(7) :076019, 2011. (Cité en pages 94 et 117.)
- [158] O. Azucena, J. Crest, S. Kotadia, W. Sullivan, X. Tao, M. Reinig, D. Gavel, S. Olivier, and J. Kubby. Adaptive optics wide-field microscopy using direct wavefront sensing. *Optics Letters*, 36(6) :825–827, 2011. (Cité en page 94.)
- [159] R. F. Kalpin, D. R. Daily, and W. Sullivan. Use of dextran beads for live analysis of the nuclear division and nuclear envelope breakdown/reformation cycles in the drosophila embryo. *Biotechniques*, 17(4) :732–733, 1994. (Cité en page 94.)
- [160] O. Albert, L. Sherman, G. Mourou, T. B. Norris, and G. Vdovin. Smart microscope : an adaptive optics learning system for aberration correction in multiphoton confocal microscopy. *Optics Letters*, 25(1) :52–54, 2000. (Cité en page 94.)

- [161] L. R. Sherman, O. Albert, C. F. Schmidt, G. V. Vdovin, G. A. Mourou, and T. B. Norris. Adaptive compensation of aberrations in ultrafast 3D microscopy using a deformable mirror. volume 3919, pages 9–13. SPIE, 2000. (Cité en pages [94](#) et [115](#).)
- [162] N. Olivier, D. Débarre, and E. Beaulieu. Dynamic aberration correction for multiharmonic microscopy. *Optics Letters*, 34(20) :3145–3147, 2009. (Cité en page [94](#).)
- [163] D. Débarre, E. J. Botcherby, M. J. Booth, and T. Wilson. Adaptive optics for structured illumination microscopy. *Optics Express*, 16(13) :9290–9305, 2008. (Cité en pages [94](#) et [115](#).)
- [164] D. Débarre, M. J. Booth, and T. Wilson. Image based adaptive optics through optimisation of low spatial frequencies. *Optics Express*, 15(13) :8176–8190, 2007. (Cité en page [95](#).)
- [165] C. Boyer, V. Michau, and G. Rousset. Adaptive optics : interaction matrix measurements and real time control algorithms for the come-on project. *Proc. SPIE*, 1271 :63–81, 1990. (Cité en page [100](#).)
- [166] J. Mertz, H. Paudel, and T. G. Bifano. Field of view advantage of conjugate adaptive optics in microscopy applications. *Applied Optics*, 54(11) :3498–3506, 2015. (Cité en page [103](#).)
- [167] J. Li, D. R. Beaulieu, H. Paudel, R. Barankov, T. G. Bifano, and J. Mertz. Conjugate adaptive optics in widefield microscopy with an extended-source wavefront sensor. *Optica*, 2(8) :682–688, 2015. (Cité en page [103](#).)
- [168] M. Born and E. Wolf. Chapter iv - the diffraction theory of aberrations. In Max Born and Emil Wolf, editor, *Principles of Optics (Sixth (Corrected) Edition)*, pages 459 – 490. Pergamon, 1980. (Cité en page [104](#).)
- [169] J. C. Wyant and K. Creath. Basic wavefront aberration theory for optical metrology. *Applied optics and optical engineering*, 11(29), 1992. (Cité en pages [106](#) et [117](#).)
- [170] B. Ya. Gerlovin and N. A. Istomina. Method of calculating the optical transfer function for astigmatism and defocusing. *Journal of Optical Technology*, 69(9) :640, 2002. (Cité en page [108](#).)
- [171] P. T. Galwaduge, S. H. Kim, L. E. Grosberg, and E. M. C. Hillman. Simple wavefront correction framework for two-photon microscopy of in-vivo brain. *Biomedical Optics Express*, 6(8) :2997–3013, 2015. (Cité en page [115](#).)
- [172] A. Thayil and M. J. Booth. Self calibration of sensorless adaptive optical microscopes. *Journal of the European Optical Society : Rapid Publications*, 6, 2011. (Cité en page [115](#).)
- [173] J. M. Beckers. Increasing the size of the isoplanatic patch with multiconjugate adaptive optics. In M.-H. Ulrich, editor, *European Southern Observatory Conference and Workshop Proceedings*, volume 30, page 693, 1988. (Cité en page [117](#).)
- [174] R. D. Simmonds and M. J Booth. Modelling of multi-conjugate adaptive optics for spatially variant aberrations in microscopy. *Journal of Optics*, 15(9) :094010, 2013. (Cité en page [117](#).)

- [175] C. Bourgenot, G. D. Love, C. D. Saunter, and J. M. Girkin. Wide field adaptive optics microscopy using both closed loop correction and image sharpness optimization. In *Imaging and Applied Optics*, OSA Technical Digest (CD), pages JTua2+, Toronto, Canada, July 2011. OSA. (Cité en page [118](#).)
- [176] C. Bourgenot, C. D. Saunter, G. D. Love, and J. M. Girkin. Comparison of closed loop and sensorless adaptive optics in widefield optical microscopy. *Journal of the European Optical Society : Rapid Publications*, 8, 2013. (Cité en page [118](#).)
- [177] J. W. Wang, A. M. Wong, J. Flores, L. B. Vosshall, and R. Axel. Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell*, 112(2) :271–282, 2003. (Cité en pages [119](#), [157](#) et [158](#).)
- [178] J. D. Seelig, M. E. Chiappe, G. K. Lott, A. Dutta, J. E. Osborne, M. B. Reiser, and V. Jayaraman. Two-photon calcium imaging from head-fixed Drosophila during optomotor walking behavior. *Nature Methods*, 7(7) :535–540, 2010. (Cité en page [119](#).)
- [179] A. Leray, K. Lillis, and J. Mertz. Two-photon fluorescence background rejection by differential aberration imaging. In Ammasi Periasamy and Peter T. C. So, editors, *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences VII*, volume 6442 of *SPIE Proceedings*, pages 64421G+, San Jose, CA, USA, February 2007. Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, SPIE. (Cité en page [120](#).)
- [180] A. Leray, K. Lillis, and J. Mertz. Enhanced Background Rejection in Thick Tissue with Differential-Aberration Two-Photon Microscopy. *Biophysical Journal*, 94(4) :1449–1458, 2008. (Cité en page [120](#).)
- [181] B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang. Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science*, 319(5864) :810–813, 2008. (Cité en page [120](#).)
- [182] A. C. Keene and S. Waddell. Drosophila olfactory memory : single genes to complex neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(5) :341–354, 2007. (Cité en page [123](#).)
- [183] Y. Wang, H. F. Guo, T. A. Pologruto, F. Hannan, I. Hakker, K. Svoboda, and Y. Zhong. Stereotyped odor-evoked activity in the mushroom body of Drosophila revealed by green fluorescent protein-based Ca<sup>2+</sup> imaging. *The Journal of Neuroscience*, 24(29) :6507–6514, 2004. (Cité en pages [123](#) et [157](#).)
- [184] A. C. Lin, A. M. Bygrave, A. de Calignon, T. Lee, and G. Miesenbock. Sparse, decorrelated odor coding in the mushroom body enhances learned odor discrimination. *Nature Neuroscience*, 17(4) :559–568, 2014. (Cité en pages [123](#), [157](#) et [204](#).)
- [185] M. Murthy, I. Fiete, and G. Laurent. Testing odor response stereotypy in the drosophila mushroom body. *Neuron*, 59(6) :1009–1023, 2008. (Cité en page [123](#).)
- [186] A. Nakano. Spinning-disk confocal microscopy, a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic. *Cell structure and Function*, 27(5) :349–355, 2002. (Cité en page [123](#).)
- [187] R. Salomé, Y. Kremer, S. Dieudonné, J.-F. Léger, O. Krichevsky, C. Wyart, D. Chatenay, and L. Bourdieu. Ultrafast random-access scanning in two-photon microscopy using acousto-optic deflectors. *Journal of Neuroscience Methods*, 154(1-2) :161–174, 2006. (Cité en page [123](#).)

- [188] A. S. Chiang and al. Three-dimensional reconstruction of brain-wide wiring networks in drosophila at single-cell resolution. *Current Biology*, 21(1) :1–11, 2011. (Cité en page [125](#).)
- [189] T.-P. Pai, C.-C. Chen, H.-H. Lin, A.-L. Chin, J. S. Lai, P.-T. Lee, T. Tully, and A.-S. Chiang. Drosophila ORB protein in two mushroom body output neurons is necessary for long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(19) :7898–7903, 2013. (Cité en page [125](#).)
- [190] P.-Y. Plaçais, S. Trannoy, A. B. Friedrich, H. Tanimoto, and T. Preat. Two pairs of mushroom body efferent neurons are required for appetitive long-term memory retrieval in drosophila. *Cell Reports*, 5(3) :769–780, 2013. (Cité en page [125](#).)
- [191] J. M. Weislogel, C. P. Bengtson, M. K. Muller, J. N. Hortsch, M. Bujard, C. M. Schuster, and H. Bading. Requirement for nuclear calcium signaling in drosophila long-term memory. *Science Signaling*, 6(274) :ra33, 2013. (Cité en pages [145](#) et [167](#).)
- [192] S. Preibisch, S. Saalfeld, J. Schindelin, and P. Tomancak. Software for bead-based registration of selective plane illumination microscopy data. *Nature Methods*, 7(6) :418–419, 2010. (Cité en pages [150](#) et [175](#).)
- [193] R. C. Gonzalez and R. E. Woods. *Digital Image Processing (3rd Edition)*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ, USA, 2006. (Cité en page [152](#).)
- [194] E. C. Marin, G. S. Jefferis, T. Komiyama, H. Zhu, and L. Luo. Representation of the glomerular olfactory map in the drosophila brain. *Cell*, 109(2) :243–255, 2002. (Cité en page [157](#).)
- [195] H. H. Lin, J. S. Lai, A. L. Chin, Y. C. Chen, and A. S. Chiang. A map of olfactory representation in the drosophila mushroom body. *Cell*, 128(5) :1205–1217, 2007. (Cité en page [157](#).)
- [196] Y. Wang, N. J.D. Wright, H.-F. Guo, Z. Xie, K. Svoboda, R. Malinow, D. P. Smith, and Y. Zhong. Genetic manipulation of the odor-evoked distributed neural activity in the drosophila mushroom body. *Neuron*, 29(1) :267–276, 2001. (Cité en page [157](#).)
- [197] Z. Lei, K. Chen, H. Li, H. Liu, and A. Guo. The GABA system regulates the sparse coding of odors in the mushroom bodies of Drosophila. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(1) :35–40, 2013. (Cité en pages [157](#), [190](#) et [204](#).)
- [198] N. Gervasi, P. Tchenio, and T. Preat. PKA dynamics in a Drosophila learning center : coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron*, 65(4) :516–529, 2010. (Cité en pages [158](#) et [214](#).)
- [199] T. Shimosawa and al. Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pin-hole cross-talk for intravital imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9) :3399–3404, 2013. (Cité en page [159](#).)
- [200] V. Fraisier, G. Clouvel, A. Jasaitis, A. Dimitrov, T. Piolot, and J. Salamero. Adaptive optics in spinning disk microscopy : improved contrast and brightness by a simple and fast method. *Journal of Microscopy*, 259(3) :219–27, 2015. (Cité en pages [159](#) et [160](#).)
- [201] B. Biermann, S. Sokoll, J. Klueva, M. Missler, J. S. Wiegert, J. B. Sibarita, and M. Heine. Imaging of molecular surface dynamics in brain slices using single-particle tracking. *Nature communications*, 3024(5), 2014. (Cité en page [161](#).)

- [202] Y.-C. Kim, H.-G. Lee, and K.-A. Han. D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in drosophila. *The Journal of Neuroscience*, 27(29) :7640–7647, 2007. (Cité en pages 167 et 193.)
- [203] G. Dietzl, D. Chen, F. Schnorrer, K.-C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oppel, S. Scheiblauer, A. Couto, V. Marra, K. Keleman, and B. J. Dickson. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila. *Nature*, 448(7150) :151–156, 2007. (Cité en page 171.)
- [204] G. M. Technau. Fiber number in the mushroom bodies of adult drosophila melanogaster depends on age, sex and experience. *Journal of Neurogenetics*, 1(2) :113–126, 1984. (Cité en page 175.)
- [205] M. J. Berridge. Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21(1) :13–26, 1998. (Cité en page 184.)
- [206] A. Froese, P. Szyszka, and R. Menzel. Effect of GABAergic inhibition on odorant concentration coding in mushroom body intrinsic neurons of the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 200(3) :183–195, 2014. (Cité en page 190.)
- [207] D. Lee, H. Su, and D. K. O’Dowd. GABA receptors containing Rdl subunits mediate fast inhibitory synaptic transmission in Drosophila neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(11) :4625–4634, 2003. (Cité en page 190.)
- [208] T.A. Christensen, B.R. Waldrop, and Hildebrand J.G. GABAergic mechanisms that shape the temporal response to odors in moth olfactory projection neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855 :475–481, 1998. (Cité en page 190.)
- [209] X. Liu, W. C. Krause, and R. L. Davis. GABA<sub>A</sub> receptor Rdl inhibits Drosophila olfactory associative learning. *Neuron*, 56(6) :1090–1102, 2007. (Cité en page 190.)
- [210] Y. Wu, Q. Ren, H. Li, and A. Guo. The GABAergic anterior paired lateral neurons facilitate olfactory reversal learning in Drosophila. *Learning and Memory*, 19(10) :478–486, 2012. (Cité en page 190.)
- [211] M. Papadopoulou, S. Cassenaer, T. Nowotny, and G. Laurent. Normalization for sparse encoding of odors by a wide-field interneuron. *Science*, 332(6030) :721–725, 2011. (Cité en page 190.)
- [212] L. M. Masuda-Nakagawa, K. Ito, T. Awasaki, and C. J. O’Kane. A single GABAergic neuron mediates feedback of odor-evoked signals in the mushroom body of larval Drosophila. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(35), 2014. (Cité en page 190.)
- [213] M. J. Palmer and J. Harvey. Honeybee Kenyon cells are regulated by a tonic GABA receptor conductance. *Journal of Neurophysiology*, 112(8) :2026–2035, 2014. (Cité en page 190.)
- [214] P.-Y. Placais, S. Trannoy, G. Isabel, Y. Aso, I. Siwanowicz, G. Belliard-Guerin, P. Vernier, S. Birman, H. Tanimoto, and T. Preat. Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate long-term memory formation in Drosophila. *Nature Neuroscience*, 15(4) :592–599, 2012. (Cité en pages 191 et 192.)
- [215] T. Riemensperger, T. Völler, P. Stock, E. Buchner, and A. Fiala. Punishment prediction by dopaminergic neurons in drosophila. *Current Biology*, 15(21) :1953–1960, 2005. (Cité en pages 191 et 192.)

- [216] S. Q. Lima and G. Miesenböck. Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. *Cell*, 121(1) :141–152, 2005. (Cité en page [191](#).)
- [217] T. Lebestky, J.-S. C. Chang, H. Dankert, L. Zelnik, Y.-C. Kim, K.-A. Han, F. W. Wolf, P. Perona, and D. J. Anderson. Two different forms of arousal in drosophila are oppositely regulated by the dopamine D1 receptor ortholog dopr via distinct neural circuits. *Neuron*, 64(4) :522–536, 2009. (Cité en page [191](#).)
- [218] T. Riemensperger, G. Isabel, H. Coulom, K. Neuser, L. Seugnet, K. Kume, M. Iché-Torres, M. Cassar, R. Strauss, T. Preat, J. Hirsh, and S. Birman. Behavioral consequences of dopamine deficiency in the drosophila central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2) :834–839, 2011. (Cité en page [191](#).)
- [219] L. Seugnet, Y. Suzuki, L. Vine, L. Gottschalk, and P. J. Shaw. D1 receptor activation in the mushroom bodies rescues sleep-loss-induced learning impairments in drosophila. *Current Biology*, 18(15) :1110–1117, 2008. (Cité en page [191](#).)
- [220] S. Zhang, Y. Yin, H. Lu, and A. Guo. Increased dopaminergic signaling impairs aversive olfactory memory retention in drosophila. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370(1) :82–86, 2008. (Cité en pages [191](#) et [192](#).)
- [221] Scott Waddell. Reinforcement signalling in drosophila ; dopamine does it all after all. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(3) :324–329, 2013. (Cité en page [191](#).)
- [222] C. Liu, P.-Y. Placais, N. Yamagata, B. D. Pfeiffer, Y. Aso, A. B. Friedrich, I. Siwanowicz, G. M. Rubin, T. Preat, and H. Tanimoto. A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in Drosophila. *Nature*, 488(7412) :512–516, 2012. (Cité en pages [191](#) et [192](#).)
- [223] M. Schwaerzel, M. Monastirioti, H. Scholz, F. Friggi-Grelin, S. Birman, and M. Heisenberg. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in drosophila. *The Journal of Neuroscience*, 23(33) :10495–10502, 2003. (Cité en page [191](#).)
- [224] Z. Mao and R. L. Davis. Eight different types of dopaminergic neurons innervate the Drosophila mushroom body neuropil : anatomical and physiological heterogeneity. *Frontiers in neural circuits*, 3, 2009. (Cité en page [191](#).)
- [225] A. Claridge-Chang, R. D. Roorda, E. Vrontou, L. Sjulson, H. Li, J. Hirsh, and G. Miesenböck. Writing memories with light-addressable reinforcement circuitry. *Cell*, 139(2) :405–415, 2009. (Cité en page [192](#).)
- [226] Y. Aso, I. Siwanowicz, L. Bräcker, K. Ito, T. Kitamoto, and H. Tanimoto. Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. *Current Biology*, 20(16) :1445–1451, 2010. (Cité en page [192](#).)
- [227] Y. Aso, A. Herb, M. Ogueta, I. Siwanowicz, T. Templier, A. B. Friedrich, K. Ito, H. Scholz, and H. Tanimoto. Three dopamine pathways induce aversive odor memories with different stability. *PLoS genetics*, 8(7) :e1002768+, 2012. (Cité en page [192](#).)
- [228] J. A. Berry, I. Cervantes-Sandoval, E. P. Nicholas, and R. L. Davis. Dopamine is required for learning and forgetting in Drosophila. *Neuron*, 74(3) :530–542, 2012. (Cité en pages [192](#) et [201](#).)

- [229] J. A. Mustard, K. T. Beggs, and A. R. Mercer. Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 59(3) :103–117, 2005. (Cité en page 192.)
- [230] K.-A. Han, N. S. Millar, M. S. Grotewiel, and R. L. Davis. DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* Mushroom Bodies. *Neuron*, 16(6) :1127–1135, 1996. (Cité en pages 192 et 193.)
- [231] Y.-C. Kim, H.-G. Lee, C.-S. Seong, and K.-A. Han. Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expression Patterns*, 3(2) :237–245, 2003. (Cité en page 192.)
- [232] G. Feng, F. Hannan, V. Reale, Y. Y. Hon, C. T. Kousky, Peter D. Evans, and L. M. Hall. Cloning and functional characterization of a novel dopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Neuroscience*, 16(12) :3925–3933, 1996. (Cité en pages 193 et 202.)
- [233] M. Selcho, D. Pauls, K.-A. Han, R. F. Stocker, and A. S. Thum. The role of dopamine in *Drosophila* larval classical olfactory conditioning. *PLoS ONE*, 4(6) :e5897+, 2009. (Cité en page 193.)
- [234] P.-Y. Musso, P. Tchenio, and T. Preat. Delayed dopamine signaling of energy level builds appetitive long-term memory in *Drosophila*. *Cell Reports*, 10(7) :1023–1031, 2015. (Cité en page 193.)
- [235] M. Ohkura, T. Sasaki, J. Sadakari, K. Gengyo-Ando, Y. Kagawa-Nagamura, C. Kobayashi, Y. Ikegaya, and J. Nakai. Genetically encoded green fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with improved detectability for neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *PLoS ONE*, 7 :1–10, 2012. (Cité en pages 200 et 205.)
- [236] Z. Han, L. Jin, J. Platisa, L. B. Cohen, B. J. Baker, and V. A. Pieribone. Fluorescent protein voltage probes derived from ArcLight that respond to membrane voltage changes with fast kinetics. *PLoS ONE*, 8(11) :e81295, 2013. (Cité en pages 200 et 201.)
- [237] L. Jin L. B. Cohen D. A. Storace, O. R. Braubach and U. Sung. Monitoring brain activity with protein voltage and calcium sensors. *Scientific Reports*, 5 :1–15, 2015. (Cité en page 200.)
- [238] J. M. Kralj, A. D. Douglass, D. R. Hochbaum, D. Maclaurin, and A. E. Cohen. Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. *Nature Methods*, 9(1) :90–95, 2012. (Cité en page 201.)
- [239] Y. Gong, J. Z. Li, and M. J. Schnitzer. Enhanced archaerhodopsin fluorescent protein voltage indicators. *PLoS ONE*, 8(6) :e66959, 2013. (Cité en page 201.)
- [240] D. R. Hochbaum and al. All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nature Methods*, 11(8) :825–833, 2014. (Cité en page 201.)
- [241] F. St-Pierre, J. D. Marshall, Y. Yang, Y. Gong, M. J. Schnitzer, and M. Z. Lin. High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nature Neuroscience*, 17(6) :884–889, 2014. (Cité en pages 201 et 211.)
- [242] M. Cassar, A.-R. Issa, T. Riemensperger, C. Petitgas, T. Rival, H. Coulom, M. Iché-Torres, K.-A. Han, and S. Birman. A dopamine receptor contributes to paraquat-induced

- neurotoxicity in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics*, 24(1) :197–212, 2015. (Cité en page 202.)
- [243] Vi. Reale, F. Hannan, L. M. Hall, and P. D. Evans. Agonist-specific coupling of a cloned *Drosophila melanogaster* D1-like dopamine receptor to multiple second messenger pathways by synthetic agonists. *The Journal of Neuroscience*, 17(17) :6545–6553, 1997. (Cité en page 202.)
- [244] T. Kuner and G. J. Augustine. A genetically encoded ratiometric indicator for chloride : Capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 27(3) :447–459, 2000. (Cité en page 203.)
- [245] O. Markova, M. Mukhtarov, E. Real, Y. Jacob, and P. Bregestovski. Genetically encoded chloride indicator with improved sensitivity. *Journal of Neuroscience Methods*, 170(1) :67–76, 2008. (Cité en page 203.)
- [246] M. Hiroi, M. Ohkura, J. Nakai, N. Masuda, K. Hashimoto, K. Inoue, A. Fiala, and T. Tabata. Principal component analysis of odor coding at the level of third-order olfactory neurons in *drosophila*. *Genes to Cells*, 18(12) :1070–1081, 2013. (Cité en page 204.)
- [247] B. Sakmann and E. Neher. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual Review of Physiology*, 46(1) :455–472, 1984. (Cité en page 204.)
- [248] R. I. Wilson, G. C. Turner, and G. Laurent. Transformation of olfactory representations in the *drosophila* antennal lobe. *Science*, 303(5656) :366–370, 2004. (Cité en page 204.)
- [249] M. Murphy and G. Turner. Dissection of the head cuticle and sheath of living flies for whole-cell patch-clamp recordings in the brain. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2 :134–139, 2013. (Cité en page 204.)
- [250] N. W. Gouwens and R. I. Wilson. Signal propagation in *Drosophila* central neurons. *The Journal of neuroscience*, 29(19) :6239–6249, 2009. (Cité en page 204.)
- [251] J. Mattila, A. Bremer, L. Ahonen, R. Kostainen, and O. Puig. *Drosophila* FoxO regulates organism size and stress resistance through an adenylate cyclase. *Molecular and Cellular Biology*, 29(19) :5357–5365, 2009. (Cité en page 214.)

**Titre :** Microscopie de fluorescence rapide et optique adaptative pour l'étude fonctionnelle tridimensionnelle *in vivo* des réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire chez *Drosophila melanogaster*.

**Mots clés :** neurosciences, *Drosophila melanogaster*, microscopie à illumination structurée, optique adaptative, imagerie fonctionnelle, biosenseurs fluorescents

**Résumé :** L'utilisation de techniques de microscopie optique de plus en plus performantes a permis des avancées considérables en neurobiologie. Néanmoins, la population de neurones mise en jeu lors de la formation de la mémoire, ainsi que sa dynamique restent à ce jour très peu connues. L'objectif de la thèse est de développer puis d'utiliser deux types de microscopies originales couplées à des sondes fluorescentes de dernière génération (sondes calciques G-CaMP6f et sonde voltage ArcLight) pour l'étude *in vivo* des réseaux neuronaux impliqués dans la mémorisation chez la drosophile. Le choix du modèle *Drosophila melanogaster* pour cette étude neurobiologique est justifié par plusieurs atouts uniques : un cerveau peu volumineux, des capacités d'apprentissage remarquables, la possibilité d'analyser un réseau neuronal dans sa globalité avec une résolution cellulaire et la disponibilité d'outils génétiques très perfectionnés pour son étude. Le premier type de microscopie conçu est celui dite à illumination structurée de type

HiLo permettant d'obtenir une coupe optique en profondeur. Nous avons alors étudié le rôle de divers récepteurs, tels que les récepteurs dopaminergiques et gabaergiques dans la transmission de l'information punitive jusqu'aux neurones des corps pédonculés. Nous avons également mis en évidence une non-homogénéité spatiale des neurones de type  $\alpha/\beta$  des corps pédonculés en termes d'excitation et d'inhibition en réponse à une stimulation punitive pour une profondeur d'analyse d'environ 10 à 20  $\mu\text{m}$ . Cette profondeur limite étant imposée par les aberrations, nous avons alors implémenté une boucle d'optique adaptative dans notre microscope. Cela a permis de réaliser des analyses morphologiques jusqu'à 50  $\mu\text{m}$  de profondeur. Le second type de microscopie développé est la microscopie multicon focale de type « spinning disk » dans le but d'imager l'ensemble des corps cellulaires des neurones des corps pédonculés. Le développement de ce projet est en cours afin de répondre à des questions biologiques d'intérêt.

**Title :** Fast fluorescence microscopy and adaptive optics for *in vivo* tridimensional functional imaging of neural circuits involved in memory formation in *Drosophila Melanogaster*

**Keywords :** neuroscience, *Drosophila melanogaster*, structured illumination microscopy, adaptive optics, functional imaging, fluorescent biosensors

**Abstract:** Cellular and neural network dynamics involved in memory formation remain poorly known despite the progress brought by advanced optical microscopies to neurobiology. The use of *Drosophila melanogaster* as a model organism constitute one of the most promising approaches due to its unique features: a small brain size, outstanding learning capabilities, very powerful genetic tools and the possibility to analyze a whole neural network with a cellular resolution. To this aim, we implemented two types of optical fluorescence microscopes coupled to cutting-edge fluorescent biosensors, calcic G-CaMP6f and voltage ArcLight probes. We used HiLo structured illumination, a technique able to provide axial optical sectioning, deep in the brain, to study the role of dopaminergic

and gabaergic molecular receptors in the transmission of aversive stimulus to mushroom bodies neurons. We also evidenced a non-uniform response of type  $\alpha/\beta$  mushroom bodies neurons under electrical stimulation at 10 to 20  $\mu\text{m}$  depth of analysis. To penetrate deeper in the brain, we added an adaptive optics feedback loop into our microscope in order to overcome aberrations issues. We were then able to rebuild optical sections down to 50  $\mu\text{m}$  depth. The second type of microscopy we developed is a multiconfocal microscope using spinning disk. The aim was to image all the mushroom bodies neurons, at the level of their cell bodies, with a cellular resolution. Since this project is at its beginning, it did not allow us to answer to advanced biological questions yet.