



HAL
open science

Visualisation de l'activité du cortex somatosensoriel primaire des souris dans de cadre de l'étude du traitement prédictif de l'information sensorielle tactile

Timothé Jost-Mousseau

► **To cite this version:**

Timothé Jost-Mousseau. Visualisation de l'activité du cortex somatosensoriel primaire des souris dans de cadre de l'étude du traitement prédictif de l'information sensorielle tactile. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS534 . tel-04115834

HAL Id: tel-04115834

<https://theses.hal.science/tel-04115834>

Submitted on 2 Jun 2023

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 158 – ED3C

Visualisation de l'activité du cortex somatosensoriel primaire des souris dans le cadre de l'étude du traitement prédictif de l'information sensorielle tactile

Timothé Jost-Mousseau

Thèse de doctorat

Spécialité : Cerveau, Cognition, Comportement

Préparée à l'Institut de Neurosciences Paris-Saclay
Equipe Traitement sensori-moteur et plasticité

Dirigée par Dr. Isabelle Férézou et Dr. Daniel E. Shulz

Présentée et soutenue publiquement le 04/10/2022

Devant un jury composé de :

- Bureau, Ingrid, Chargée de recherche, Rapportrice.
- Epsztein Jérôme, Chargé de recherche, Rapporteur.
- Ventalon Cathie, Chargée de recherche, Examinatrice.
- Zugaro Michaël, Directeur de recherche, Examineur.
- Chavane Frédéric, Directeur de Recherche, Examineur.
- Férézou Isabelle, Directrice de recherche, Directrice de thèse.
- Shulz Daniel. E., Directeur de recherche, Directeur de thèse.

A mes grands-parents,

Remerciements

Je remercie les membres de mon jury : Ingrid Bureau, Jérôme Epsztein, Cathie Ventalon, Michael Zugaro et Frédéric Chavane, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse dans cet environnement reculé et singulier : le centre CEA de Saclay, où se rencontrent barbelés, équipements de recherche atomistique, ragondins et odeur de blé fraîchement coupé !

Avant tout, je t'adresse d'immenses remerciements, Isabelle. Ton investissement dans tous les aspects du déroulement de ce projet scientifique a toujours été total. C'était un réel plaisir de me sentir aussi bien encadré et de pouvoir venir toquer à ta porte au moindre doute ! J'ai énormément appris à ton contact. Tant sur le plan humain que scientifique... voire stratégique ! Lors de chaque réunion scientifique au labo, de chaque discussion avec les acteurs du monde étrange de la « valorisation », tu fais preuve d'une lecture aiguisée de tous les enjeux et limites scientifiques, stratégiques, techniques, professionnelles ; doublés d'une grande intelligence humaine. Je sais qu'à quelques égards, je ne suis pas un doctorant tout à fait ordinaire, un peu trop porté le développement technique. Ce travers se ressent d'ailleurs dans la forme finale et la dimension de mon manuscrit. Pourtant dès le début de ma thèse, tu as bien voulu et su t'adapter à ces obsessions un peu étranges qui sont les miennes, et tu m'as fait confiance lorsque je m'engageais dans la résolution de quelque souci technique. Je t'en suis infiniment reconnaissant ! Tu as d'ailleurs été une oreille attentive à chacun de mes errements et réflexions relatives à mon avenir professionnel. Plus que cela, tu as été à l'initiative de tellement de démarches avec ces préoccupations en tête (en premier lieu le dépôt de brevet ! bravo et merci pour ce qui aura finalement été un gros morceau de la thèse). Je sais que tu es très investie dans le mentorat (au sens le plus fort du terme) et du bien-être de tes doctorants. Ton implication dans la vie de l'institut et ton sens du « commun » sont de vrais exemples. Toutes ces actions traduisent les magnifiques valeurs morales altruistes qui t'animent et t'honorent. J'ai d'ailleurs adoré partager avec toi maintes réflexions et décorticages sous un angle politique à propos des éléments qui structurent notre milieu professionnel comme nos sociétés en général. Nos premiers échanges, autour de ce (très peu remarquable) sandwich au thon sur le parvis de Jussieu, resteront toujours gravés dans ma mémoire. Je te remercie d'avoir bien voulu me confier la mise en place de ce projet de thèse ambitieux, en dépit de mes faiblottes qualités de communication (je te remercie encore milles fois pour la correction de ce manuscrit qui était à bien des égards, souvent un peu abscond !). Tu es une formidable directrice de thèse et j'ai une chance incroyable d'avoir pu réaliser la mienne avec toi.

Dan, je te suis infiniment reconnaissant d'avoir également bien voulu m'accorder ta confiance pour initier ce projet de recherche. J'ai énormément apprécié travailler dans cette admirable équipe que tu as mise en place et au sein de laquelle entretiens une émulation humaine et scientifique féconde ! Se livrer sous ton regard perçant lors des diverses présentations est toujours un subtil mélange de trac et d'excitation, de se retrouver poussé dans les retranchements de son raisonnement par ta maïeutique, pour finalement n'en conserver que la structure porteuse et discerner le cap que pointe toutes les pièces du puzzle. Tu es d'une grande sagesse et incarne ce que mon imaginaire projetait du Chercheur accompli. Je suis honoré d'avoir pu mener ma thèse sous ta direction !

Max, j'ai une grande chance que tu prennes la suite de ce projet. Tu fais preuve d'une grande gentillesse, d'humour doublé d'une intelligence et d'une adaptabilité à toute épreuve ! Je suis régulièrement impressionné par la rapidité avec laquelle tu intègres et maîtrises de nouvelles méthodes analytiques complexes. Tous les deux, nous n'avons pas fait face à des outils mathématiques avancés durant notre cursus mais ça n'est jamais une limite pour toi ! Grâce à ton travail sur les données les plus récentes, tes résultats excitants montrent déjà le bout de leur nez, et je suis certain que tu feras de nouvelles découvertes très bientôt !

Pauline, mille mercis pour m'avoir soutenu durant mon premier passage à l'UNIC, lorsque j'ai balbutié mes premiers souhaits de participer à une thèse dans cette équipe. La découverte de la pratique concrète de la recherche et des débrouillardises propres à la Neurophysiologie a été un coup de foudre ! C'est à ta bienveillante et avisée supervision que je le dois ! Ton énergie et ta joie sont de petits soleils qui rayonnent dans les équipes où tu travailles, et je te souhaite de tout cœur que tes désirs professionnels se réalisent !

Nicolas, j'ai beaucoup apprécié ton calme apaisant, ton sérieux et nos amusantes discussions, autant avant l'apparition de ce satané virus, à entraîner nos souris rebelles, que durant cet épisode de vie cloîtrée, à coder nos analyses (farfelues !). Je te souhaite de t'épanouir à l'ICM ! Mathilde, ton autonomie, ta vivacité et ton dynamisme ont rendu ce bref mais intense stage un réel plaisir (ton mémoire était en effet PARFAIT !). Yohan, je te remercie pour ton humour et ton énergie, tu as participé à poser les premières pierres ce projet sur lesquelles il repose désormais !

Michael et Florent, je vous remercie d'avoir accompagné ma progression au cours de ces quatre années. Votre expertise m'a aidée dans la suite de mon projet scientifique ; elle a été un moment

d'effervescence cérébrale riche ! Vos conseils et votre regard aux différentes étapes m'ont porté.

Merci Aurélie pour ta gentillesse, nos discussions rigolotes, et ton autorité bienveillante, qui permet toujours d'extraire le meilleur, autant des chercheurs dissipés (je plaide coupable) que de ces espiègles souris ! Mille mercis pour toute ton aide sur mon projet, tu as investi beaucoup de temps pour m'aider à entraîner ces petits animaux, ainsi qu'à conseiller ou rechercher les méthodes pharmacologiques les plus adaptées pour nos besoins bien variés ! Guillaume, je souris tout seul en pensant à toutes les bêtises qu'on a dites. Merci pour ton humour, toujours mordant et terriblement efficace ! Je ne suis pas un aussi bon boute-en-train, mais j'ai beaucoup apprécié toutes nos discussions, les midis où l'on avait la chance de manger en ta compagnie (il faut bien nourrir le chien ainsi que la petite !). Je te remercie également plus sérieusement pour tout ton travail en lien avec mon projet ainsi que pour la sécurité de l'institut ! Patrick, un grand merci pour toute l'énergie que tu as mise dans la fabrication des éléments clés dont nous avons besoin pour faire fonctionner nos dispositifs improbables ! Merci pour tout le temps que l'on a passé à discuter de méthodes de fabrication, de machines-outils, de manufacture soustractive comme additive... et de politique ! J'ai adoré passer tout ce temps avec toi, mon seul regret a été de ne pas être apprenti mécanicien-ingénieur pour en apprendre plus à tes côtés ! Un grand merci pour toutes tes attentions, et pour ton humanisme ! Je te souhaite une excellente retraite, que tu puisses profiter de ton temps librement après ces années de services fièrement rendus à la recherche française ! Laurent et Yvon, je vous remercie tout autant pour votre tempérament formateur et nos discussions, que j'apprécie toujours énormément. J'ai une chance incroyable d'avoir pu rencontrer des personnes de votre trempe, toujours heureuses d'aider et de partager leurs connaissances sur leur métier. Après vous avoir côtoyé, c'est certain, si je m'étais orienté différemment et avais découvert cette passion plus tôt, j'aurais souhaité travailler la matière comme vous ! Joszua, un grand merci pour tes conseils et ton expertise dans le domaine de la fabrication d'implants reconnue au point d'en devenir maintenant un acteur industriel ! Je te remercie d'en avoir partagé une infime partie avec moi. Que vive et s'épanouisse Ymetry ! Valérie et Christophe, merci beaucoup pour tous les efforts que vous avez déployés pour vous occuper de nos petites bêtes et s'adapter à tous leurs différents régimes. Tiago, thanks for sharing the very valuable knowledge of making chronic PDMS windows with me while I was looking for help and solutions for my surgical issues !

Valérie, je te fais d'infinis remerciements pour ta bienveillance, le partage de ton savoir encyclopédique et pour tous ces ateliers culinaires ! Ton engagement pour l'enseignement, la participation aux commissions de divers organismes de recherche et encore d'autres rôles que j'aurais pu oublier (il y en tellement !) en dit long sur ton abnégation quand on voit combien tu aimes retourner à la paillasse et restée proche des manip ! J'ai énormément apprécié mon tout premier stage sous ta direction ainsi que celle de Pauline, et c'est grâce à vous deux que je me suis « amouraché » de cet univers mêlant recherche scientifique et technique et je vous en remercie chaleureusement. Luc, j'apprécie énormément toutes nos discussions partisans, même si nos conclusions sont souvent opposées. Je dois bien dire qu'il n'y a qu'avec toi que j'ai eu des discussions aussi cordiales, amusantes et stimulantes, tout en étant en désaccord ! Ta bonhomie et ton humour, ta grande culture ainsi que ton expertise avancée dans un nombre impressionnant de domaines (en constant élargissement, avec bientôt la robotique au vu de la tournure des événements !) sont autant de qualités qui rendent travail et discussions avec toi plaisants !

Evan, a thousand thanks for all the great discussions, advices, kind words that you always are full of. I wish that you get all the recognition you deserve, as an immense scientist and a brilliant mind! (As much for solving scientific problems than for human interactions!). Matias, thanks for your help in brainstorming the technico-surgical setbacks that I faced at the start of my thesis. You were always eager to give help to those who ask for it (an appropriate quote from Dumbledore) and this was a great pleasure. I enjoyed all the moments we shared around some alfajores! Many thanks for your inclusiveness!

Henri, je suis heureux d'avoir partagé ces quatre années de thèse en ta compagnie ! Merci pour ta bonne humeur et ton humour, souvent ponctué de tes petits cris de détresse ! Seraient-ils la recette de ton incroyable succès !? Il commence à devenir difficile de compter le nombre de papiers et de projets dans lesquels tu es impliqué ! Je te souhaite de terminer en beauté, que tu souhaites et mérites d'ici quelques mois, ainsi que de t'épanouir dans tes futurs projets professionnels !

Anton, grands mercis pour tes gentilles attentions et la disponibilité de ton aide. Ton esprit d'analyse et ta façon structurée d'aborder toute question sont de grandes qualités, qui inscrivent ta pensée sur le temps long (qui peut-être tend tristement à faire défaut à la recherche académique française, pour des raisons systémiques...). Je te souhaite la plus grande réussite dans tes projets scientifiques et professionnels !

Zineb ta constante et radiante bonne humeur éclaire le labo de mille feux ! Edouard, mille merci pour toutes les informations incroyables que tu m'a apprises sur les tracteurs (je sais maintenant que « sanglier > moissonneuse batteuse »). J'ai été ravi de passer ces derniers mois avec un passionné de procédés technologiques en tous genres. Avec Zineb et toi, les petits bébés imprimantes 3D de Luc sont entre de bonnes mains ! 🙌😊

Fan, I've been happy to share such diverse discussions with you. Your setup is awesome, don't worry about it !

Clément, Alexandre, Fatmeh, Faezeh, Tom, Thierry, Gilles, Marc, Christophe, et tous les collègues de NeuroPsi, je suis tellement heureux d'avoir partagé cet environnement de travail avec vous ! Vos passions variées et votre bienveillance qui vous caractérisent tous ; elles ont fait de ces années un réel plaisir.

Merci Aline pour toute ton aide et ta gentillesse. Tout l'ICN (et maintenant plus encore) dépend de toi et j'espère que mes oublis réguliers et mes quelques achats de produits étrangers ne t'ont pas causé trop d'arrachages de cheveux supplémentaires ! Thomas, merci pour ton ouverture, ta gentillesse et ta disponibilité malgré la quantité de travail faramineuse que tu assumes. Il semble que LearningRobots et tes projets éducatifs soient en extrêmement bonne voie, bravo à toi et à Marie, je vous souhaite le meilleur pour la suite ! Tony, j'ai apprécié venir t'embêter (un besoin en câbles un peu trop compulsif !) et discuter de technologie et d'informatique. Je te souhaite le meilleur pour la suite ! Jean Michel Hermel, je te remercie de m'avoir aidé dans mes démarches lorsque j'ai tenté de concrétiser mes projets professionnels. Pascal Abbas, merci infiniment d'avoir assumé (et peut-être c'est encore le cas ?) la charge d'être l'épicentre de toutes les demandes, avant, durant et suite au déménagement, ainsi que pour la bonne tenue des communs de NeuroPSI !

Merci mon petit papou pour tes coups de mains et ton savoir infini sur tout ce qui implique le mouvement de quelque électron comme octet ! Ma petite mamounette d'amour, un énorme merci pour nos longues discussions à imaginer des futurs heureux à jardiner et construire nos maisons ainsi qu'à propos de nos situations professionnelles de grands enfants ! Je vous fais d'énormes câlins à tous les deux et vous remercie du fond du cœur d'avoir réussi à former et maintenir une famille si aimante et bienveillante. Les moments passés en votre compagnie ne sont jamais assez longs !

Je fais de très grosses bises à tous les Ottenwaelder, et te remercie en particulier Christine pour toutes tes gentilles attentions. Denise, je te fais d'énormes bisous et te remercie pour tous tes gentils mots et les moments heureux que nous passons avec toi à chaque fois. Tu es ma troisième mamie ! Le poussin joli t'embrasse très fort.

De gros bisous et d'énormes merci à tous mes amis de « BGPC » ! Elyne, Robin, Alex, Clara et Camille, merci pour votre infinie gentillesse, tous les moments et les bêtises partagées depuis de longues années. Je fais aussi de gros bisous et à vous quatre, Marie, Serge, Nono et Sylvain ! J'ai eu la chance d'être si souvent parmi vous lors des récentes célébrations que je me sentais un peu faire partie de votre superbe petite famille !

Sommaire

Préambule.....	1
Introduction.....	2
Partie I : Rôle fonctionnel du néocortex dans le traitement sensoriel.....	2
Une néo structure, impliquée dans un grand nombre de fonctions, dont le rôle reste encore mal compris.....	2
Une organisation modulaire.....	6
Hypothèse du traitement prédictif de l'information sensorielle.....	10
Partie II : Le modèle du Système vibrissal de la souris.....	13
Une modalité sensorielle à fort couplage sensori-moteur.....	13
Implication de vS1 dans le traitement des informations sensorielles tactiles au cours de la locomotion.....	17
Partie III : Stratégie expérimentale pour lier comportement libre et lecture de l'activité de vS1.....	21
Problématique.....	24
Matériel et méthodes.....	25
Animaux.....	25
Dispositif expérimental pour l'étude des signaux d'attentes chez la souris.....	25
Arène comportementale.....	26
Imagerie rapide du comportement.....	29
Mise en place d'une approche fibrée pour l'imagerie de l'activité du cortex vS1 chez l'animal libre de ses mouvements.....	30
Faisceau de fibres optiques pour l'imagerie en comportement.....	30
Implant permettant une fixation rapide et ajustable du fibroscope.....	31
Dispositif rotatif pour l'imagerie fibrée chez l'animal éveillé.....	33
Procédures chirurgicales.....	50

Implantation	50
Imagerie intrinsèque trans-osseuse.....	51
Craniotomie et pose de fenêtre.....	52
Retrait de la fenêtre et durectomie	53
Marquage au colorant sensible au potentiel chez l'animal éveillé.....	55
Acquisition des données d'imagerie fibrée	57
Calendrier expérimental pour la réalisation d'imagerie corticale fibrée.....	57
Déroulement des sessions imagerie fibrée en comportement	58
Cartographie fonctionnelle du cortex à l'issue de la fibroscopie	59
Cartographie anatomique du cortex	59
Traitement et analyse des données d'imagerie corticale.....	60
Soustraction de la fluorescence	60
Masquage des zones présentant des variations artéfactuelles imputables au mouvement du tissu cortical.....	61
Suppression du photoblanchiment à court terme	61
Quantification des profils de fluorescence	61
Traitement et analyse des données d'imagerie du comportement.....	62
Suivi logiciel des trajectoires des souris en comportement.....	62
Quantification des dynamiques vibrissales	62
Résultats	64
Tâche d'évitement d'obstacles « statiques » : favoriser la prédictibilité des entrées sensorielles tactiles.....	64
Dynamiques spatiotemporelles de l'activité dans le cortex vS1 au cours de la tâche de locomotion.....	67
De larges vagues d'activité liées à un ajustement de la locomotion	72
Des foyers locaux d'activité potentiellement liés aux entrées vibrissales ?.....	76

Importance des entrées vibrissales pour l'exécution de la tâche d'évitement d'obstacles « statiques » chez des animaux experts.....	78
Tache d'évitement d'un obstacle « dynamique » : renforcer la saillance des entrées sensorielles tactiles.....	81
Nouvelle observation de larges vagues d'activité liées à un ajustement moteur dans ce contexte de tâche dynamique	83
Estimation des dynamiques vibrissales sensorielles et motrices.....	87
Discussion et conclusions :	91
Paradigme expérimental favorisant la récolte naturelle d'informations sensorielles.....	91
Activité du cortex vS1 durant la locomotion guidée par les vibrisses	93
Traitement prédictif de l'information dans le cortex	97
Bibliographie.....	100

Préambule

La thématique de mes travaux était centrée sur le néocortex, avec pour but de contribuer à une meilleure compréhension de la manière dont il gouverne le comportement. En utilisant le système vibrissal de la souris pour modèle, j'interroge ici plus particulièrement l'hypothèse d'un rôle prédictif du néocortex. Il participerait à construire un modèle interne des interactions avec l'environnement de manière à optimiser le comportement, tant au niveau de l'extraction de l'information sensorielle pertinente, que de la genèse efficace et rapide de commandes motrices adaptées au contexte. Pour cela j'ai adopté une stratégie consistant à enregistrer l'activité neuronale du cortex somatosensoriel primaire de souris entraînées à réaliser une tâche de locomotion impliquant le recueil d'informations tactiles par les vibrisses. En introduisant des déviations entre les entrées sensorielles attendues et effectivement reçues par l'animal, mon objectif était de mettre en évidence des signatures neuronales de mécanismes prédictifs au sein du néocortex.

Dans ce manuscrit j'ai donc décidé de faire tout d'abord une introduction générale sur cette structure, en y présentant ses origines, ses principes de connectivité, et son organisation fonctionnelle. Je décris ensuite le système modèle des vibrisses chez la souris, son implication dans un contexte de locomotion, et ce que l'on sait de l'implication possible des circuits néocorticaux dans la prédiction sensorielle tactile en son sein. Enfin j'exposerai la stratégie expérimentale que j'ai choisi d'adopter au cours de mon projet doctoral dans une troisième partie.

Introduction

Partie I : Rôle fonctionnel du néocortex dans le traitement sensoriel

Une néo structure, impliquée dans un grand nombre de fonctions, dont le rôle reste encore mal compris

Le néocortex est une structure du système nerveux central, présente chez tous les mammifères actuels, et d'apparition relativement tardive dans l'évolution : ses origines sont ainsi retracées à l'ancêtre commun de ce groupe, il y a 170 à 250 millions d'années.

Son organisation est stratifiée, divisée en 6 couches, la distinguant des autres structures laminaires dites « allocorticales » présentes chez les mammifères, que sont l'archicortex et le paléocortex et dont les origines évolutives sont, elles, plus anciennes. Ces dernières sont en effet divisées en 3 (à 4) couches et composent l'hippocampe et le cortex pyriforme, respectivement. Cette organisation stratifiée a été observée dans le néocortex dès la fin du XIXe siècle par Santiago Ramón y Cajal, notant une ségrégation sur l'axe horizontal des morphologies cellulaires et de leurs projections. La formalisation des 6 couches néocorticales, communes à tous les ordres mammifères, est ensuite établie en 1909 par Korbinan Brodmann (Zilles, 2018 **figure I1 A-B**). Les cortex hexa-laminaire comme tri-laminaire présentent en réalité des similarités d'organisation microstructurale notables. Les somas des neurones pyramidaux, y représentant la majorité des neurones excitateurs, sont localisés dans les couches intermédiaires et sont homogènement orientés sur l'axe radial au sein du tissu. En effet leurs dendrites apicales sont dirigées vers les couches superficielles, dites moléculaires car peu riches en corps cellulaires, tandis que leur axone projette en direction d'un tissu sous cortical fibreux composé majoritairement de ces projections (Bosman & Aboitiz, 2015, **figure I1 C**). La couche I, la plus superficielle, constitue ainsi une couche dite d'entrée, vers laquelle projettent les axones afférents. Ces deux types de structures corticales diffèrent en revanche notamment dans la manière dont ces axones sont organisés : dans les cortex à 3 couches, ils innervent les couches superficielles tangentiellement, tandis qu'ils traversent le tissu radialement de bas en haut dans le néocortex.

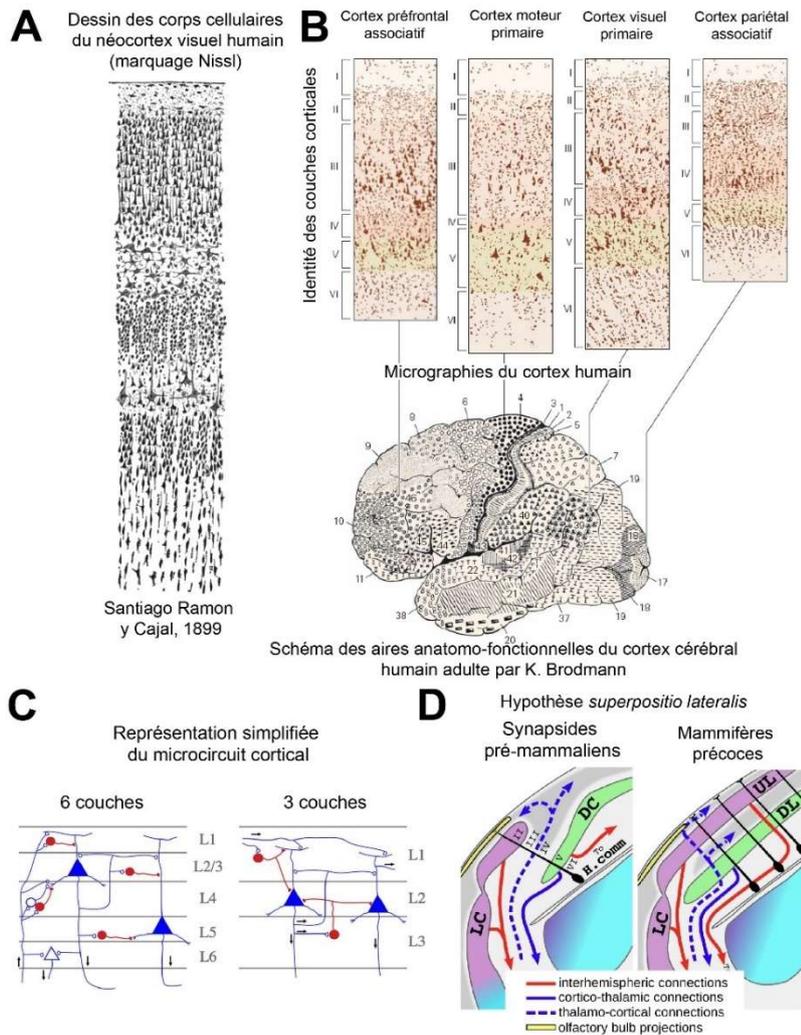


Figure 11 : Architecture corticale stratifiée

A. Dessins des couches du cortex d'après observations au microscope de tranches marquées par une coloration de Nissl. La pie-mère est orientée en haut du dessin (d'après Santiago Ramon y Cajal).

B. Micrographies des coupes corticales humaines faisant figurer la ségrégation formelle en 6 couches dans diverses aires corticales. Sur la base de leur différences cytoarchitecturales, et notamment des proportions relatives des différentes couches, Korbidian Brodman, a ainsi proposé un découpage du néocortex en 52 aires distinctes, qui se sont révélées être associées à des fonctions spécifiques (d'après Kandel - 5e édition).

C. Schéma simplifié du microcircuit canonique dans le cortex à 6 couches et les cortex à 3 couches. Les projections corticopétales et corticofugales sont représentées par des flèches noires (d'après Bosman & Aboitiz, 2015).

D. Modèle théorique de la formation d'un proto-néocortex par la superposition des cortex latéral et dorsal ancestraux. LC : cortex latéral (analogue au cortex olfactif), DC : cortex dorsal (analogue au cortex dorsal des sauropsides non aviens), UL : couche pyramidale supérieure DL : couche pyramidale inférieure (d'après Luzzati, 2015).

La compréhension du lien évolutif entre ces différents types d'organisation corticale est questionnée depuis un siècle, et bien que les tissus nerveux, mous, ne fossilisent pas et ne laissent de leur existence qu'une empreinte en négatif, les études tentant d'élucider l'origine évolutive des tissus corticaux constituent un champ de recherche actif. Elles reposent généralement sur des analyses croisées, anatomiques et moléculaires, entre les structures corticales chez les synapsides dont les seuls représentants actuels sont les mammifères, et leur groupe frère, les sauropsides, constitués des oiseaux et du groupe paraphylétique des reptiles. Il est ainsi communément avancé que les couches profondes du néocortex (V/VI) seraient analogues à la couche II du cortex dorsal des sauropsides non-aviens, partageant potentiellement une origine évolutive commune (F. Aboitiz, 2009; Luzzati, 2015; Naumann *et al.*, 2015). De récentes études, basées sur la similarité morphologique et les profils d'expression génétique cellulaires, viennent également étayer la similarité entre la couche II du néocortex et celle du cortex olfactif mammalien (Luzzati *et al.*, 2009). Ces données supportent l'hypothèse ancienne de *superpositio lateralis* (Kappers & Theunissen, 1908), expliquant l'origine du néocortex par la superposition au cours du développement, du cortex olfactif latéral et du cortex dorsal aboutissant à la formation d'un proto-néocortex chez l'ancêtre commun des mammifères (Luzzati, 2015, **figure I1 D**). Cette hypothèse permettrait ainsi d'expliquer l'organisation des multiples étages d'entrée du néocortex (couche I et IV, cette dernière étant enrichie en cellules étoilées excitatrices dans les régions sensorielles par rapport au cortex dorsal ancestral) ainsi que les deux couches « pyramidales » externe et interne, (couche II, appauvrie en cellules pyramidales par rapport au cortex dorsal ancestral, et couche V), ces deux dernières formant une néo-circuiterie interne (les cellules pyramidales de la couche II projetant largement sur celles de la couche V).

Bien sûr, la mise en évidence de nombreuses innovations évolutives subséquentes ou simultanées à cette superposition sont nécessaires pour expliquer la structure actuelle du néocortex, en particulier l'organisation radiale des projections axonales afférentes, ainsi que son organisation modulaire (voir paragraphe suivant).

Malgré la nouveauté relative de cette structure, elle s'est dramatiquement développée et occupe pour l'ensemble des mammifères une place et une masse importante en proportion de la masse totale de l'encéphale, c'est à dire entre 40 et plus de 80 % (**figure I2 A**). Cette proportion est exacerbée chez les espèces dont la masse cérébrale ou plus généralement la masse corporelle, (ces deux paramètres étant fortement corrélés), est importante (tels le capybara, les artiodactyles

et les primates, respectivement représentés en vert, rouge et violet sur la **figure I2 A**, (Herculano-Houzel, Manger and Kaas, 2014).

Si son origine évolutive supposée, composite, implique une fonction originellement associative, cet organe a depuis été impliqué dans une très grande variété de fonctions, du traitement sensoriel associatif à la production de raisonnements abstraits en passant par le contrôle moteur, la localisation, la navigation, mais aussi le traitement primaire de nombreuses modalités sensorielles. L'organisation des régions corticales impliquées dans ces divers traitements est régionalisée, et est également très conservée à travers l'arbre évolutif mammalien (**figure I2 B**).

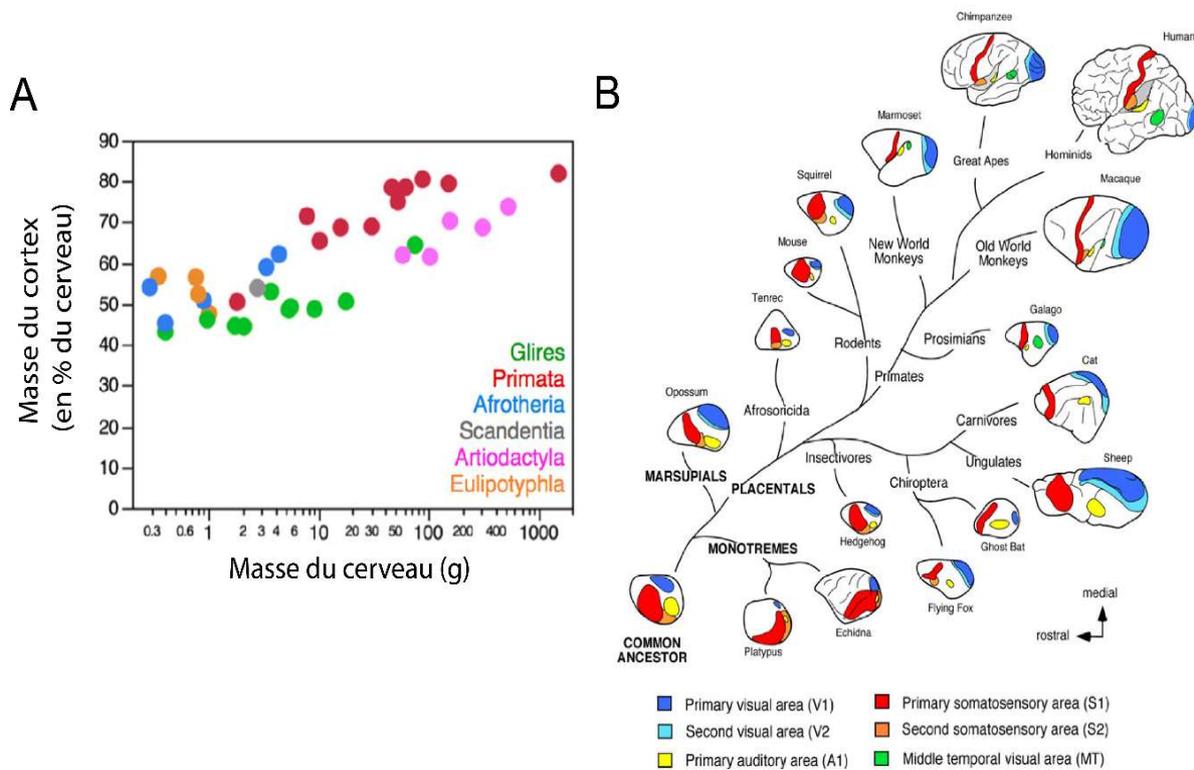


Figure I2 : Néocortex – une structure massive aux fonctions diversifiées

A. Masse du cortex en pourcentage de la masse totale absolue du cerveau de l'espèce considérée. Les espèces représentantes de multiples taxons sont identifiées par leur couleur (adapté de Herculano-Houzel, Manger and Kaas, 2014).

B. Organisation relative de diverses aires néocorticales et des fonctions sensorielles associées, à travers l'arbre phylogénétique des mammifères (adapté de Krubitzer, 2009).

Bien que la taille relative et la composition des couches IV et V varient largement en fonction du rôle, sensoriel ou moteur, associé à chaque région corticale, cette pluralité de fonctions contraste avec la grande homogénéité anatomique apparente du néocortex. L'ampleur de la diversité des rôles dans lesquels cette structure est impliquée suppose ainsi que son microcircuit supporte une forme de versatilité dans le traitement de l'information.

Une organisation modulaire

Les prémices de la démonstration de cette versatilité prenant la forme de modules dans le circuit néocortical débutent avec Lorente de No dès 1949 (Horton and Adams, 2005; Larriva-Sahd, 2014; Haueis, 2016). Celui-ci a pu reconstruire l'architecture de « cellules à axones courts » entières grâce la méthode de Golgi, et a ainsi noté la forte propension de ces cellules à projeter axones et dendrites de manière verticale plutôt qu'horizontale, malgré l'architecture laminaire bien établie à l'époque, supposant une connectivité horizontale (**figure I3 A-B**). Ces observations l'ont amené à formuler l'hypothèse selon laquelle il existerait dans le néocortex un « cylindre vertical (...) pouvant être dénommé unité élémentaire, dans lequel, théoriquement, le processus complet de transmission des influx depuis les fibres afférentes vers les axones efférents pourrait être accompli » (Lorente de No, 1949). En 1957, Vernon Mountcastle est inspiré par ces travaux et ceux de son contemporain, Roger Sperry. Ce dernier avait en effet montré que d'importantes séries de lésions dans le cortex visuel des chats, rendant inopérantes les connexions horizontales à longue distance, n'empêchaient pas les capacités visuelles de discernement de l'animal, suggérant que la fonction corticale du cortex lésé ne reposait que peu sur ces projections (Sperry, Miner and Myers, 1955). Mountcastle fait lui-même la découverte, cette fois en enregistrant l'activité fonctionnelle des neurones du cortex somatosensoriel chez le chat, qu'ils présentent des champs récepteurs cutanés périphériques similaires par leur taille, forme et position, sur toute la profondeur de la pénétration de l'électrode dans le tissu. Cette similarité apparaissait à condition que l'électrode soit introduite de manière perpendiculaire à la surface corticale. En effet, lors de pénétrations à 45 °, les neurones enregistrés montraient des champs récepteurs qui se décalaient graduellement à mesure de la pénétration. Couplées à celles de ses pairs, ses observations l'amènent à formuler l'hypothèse que la « colonne corticale » est l'unité fonctionnelle du traitement de l'information dans le cortex somatosensoriel, et dont les neurones possèdent des propriétés physiologiques communes (Mountcastle, 1997).

Hubel et Wiesel viennent confirmer cette observation dans le cortex visuel des chats en 1962, démontrant cette fois que l'ensemble des neurones d'un module cortical affichent une sélectivité identique à l'orientation d'une barre dans le champ récepteur visuel associé (Hubel and Wiesel, 1962).

C'est ensuite Woolsey et Van der Loos, en 1970, qui vont apporter à leur tour des données supportant l'hypothèse d'une organisation en modules fonctionnels verticaux du néocortex, chez une autre espèce, dotée d'un système tactile vibrissal remarquable : la souris. Ils décrivent la présence, au niveau de la couche IV du cortex somatosensoriel primaire, d'agrégats cellulaires formant des « tonneaux », dont l'arrangement spatial est similaire à celui des vibrisses sur le museau de l'animal. Ils font dès lors l'hypothèse que ces tonneaux constituent un corrélat anatomique des modules fonctionnels décrits au moyen d'enregistrements électrophysiologiques (Woolsey and van der Loos, 1970). Hypothèse qui s'est trouvée largement vérifiée par la suite, les neurones de chaque colonne correspondant à un tonneau répondant en premier lieu à la stimulation de la vibrisse qui lui correspond (Staiger and Petersen, 2021). Contrairement aux systèmes visuel et somatosensoriel du chat où les modules corticaux ne sont pas identifiables anatomiquement, l'organisation horizontale du cortex étant homogène, ces tonneaux sont en effet discernables anatomiquement et peuvent être révélés par le marquage à la cytochrome oxydase (Land and Simons, 1985).

Ces observations viennent alimenter l'idée que cette organisation en colonnes, ou modules corticaux, serait une propriété émergente résultant de l'organisation fondamentale du microcircuit cortical local. Cette propriété semblant commune à de multiples régions du néocortex, le microcircuit sous-jacent serait semblable, quelles que soient les fonctions dans lesquelles le néocortex est localement impliqué.

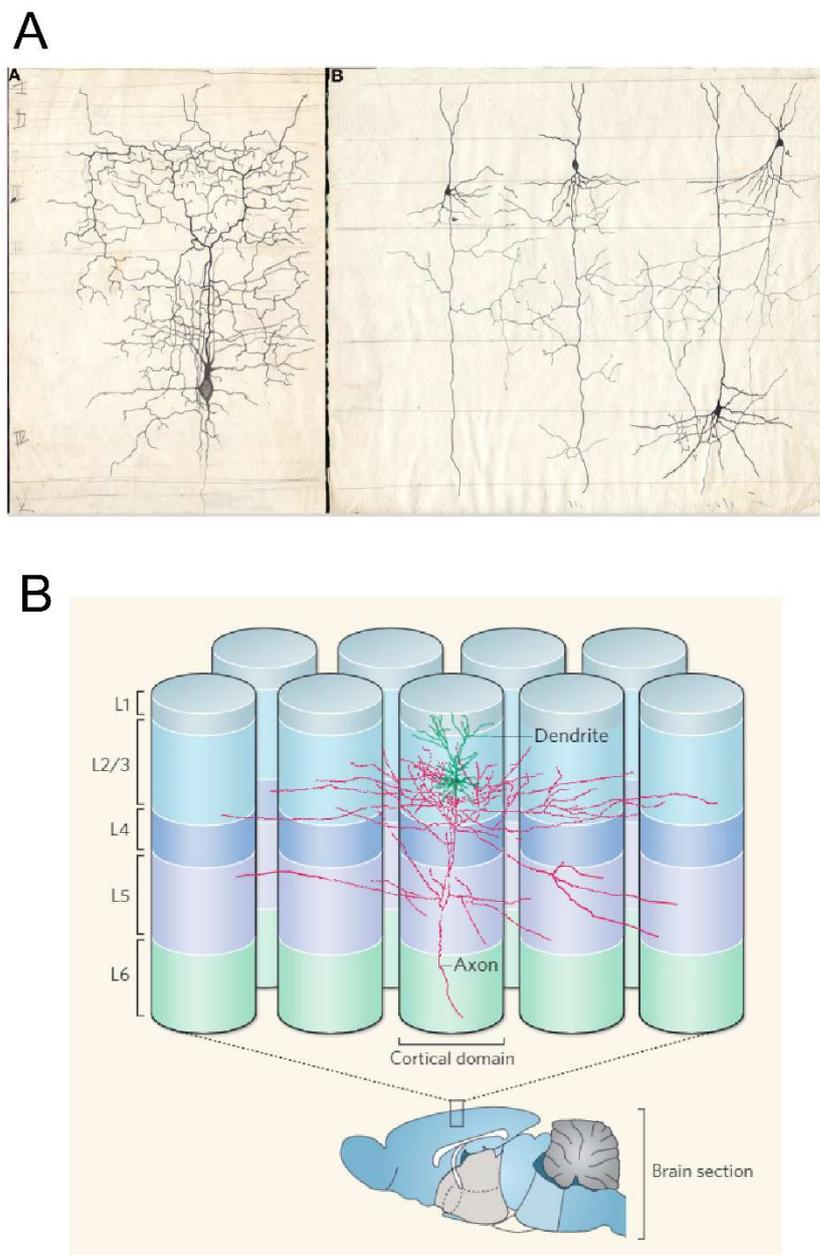


Figure 13 : La colonne corticale

A. Gauche : Dessin d'une « cellule à axone court » dans le néocortex. Droite : Dessin de quatre neurones pyramidaux du néocortex. Les dessins font figurer la position des couches corticales, et sont réalisés à partir de l'observation de tranches marquées à la méthode de Golgi (Lorente de No). **B.** Représentation schématique de colonnes corticales ainsi que de l'arborescence des dendrites (vert) et projections axonales (rouge) d'une cellule pyramidale de la couche II/III dans le cortex à tonneaux de souris (d'après Feldmeyer, 2010).

Les études plus récentes tentant d'élucider la connectivité intra-corticale à plus longue distance chez le macaque montrent que si l'interconnectivité corticale est largement variable entre aires en fonction du rôle de chacune, plus importante entre les aires associatives, qu'en entre aires primaires, cette interconnectivité horizontale reste globalement assez faible (Markov *et al.*, 2013; Oligschläger *et al.*, 2019). Certaines hypothèses suggèrent ainsi que cette forte connectivité locale et cette connectivité distante plus faible, permettant de qualifier le tissu cortical de « modulaire » à large échelle, serait une propriété favorisant l'adaptabilité fonctionnelle à long terme de la structure dans l'évolution (Casanova and Casanova, 2019). Le développement des réseaux et de l'architecture des structures neuronales est en effet le résultat de facteurs génétiques majoritairement gouvernés par des gradients d'espèces chimiques : les facteurs de différenciation, de croissance, et de migration cellulaire. Mais ils sont également régis par des phénomènes susceptibles de varier en fonction de changements environnementaux rapides, tels que l'activité neuronale elle-même, jouant un rôle clé lors du développement. A cet égard, la grande modularité du tissu cortical, et ses faibles connections entre les aires distantes, pourraient le rendre apte à de rapides réorganisations fonctionnelles face aux changements du monde sensoriel (Krubitzer and Hunt, 2007; Larsen and Krubitzer, 2008; Mehring *et al.*, 2019).

Dans ce cas, en assumant que le néocortex serait un tissu modulaire permettant un traitement « aveugle » de l'information, et dont le microcircuit canonique n'est pas spécifique d'un type particulier d'information, il serait particulièrement intéressant de comprendre quel type de processus généralisable réalise ce circuit.

Il est d'ailleurs connu que le néocortex, bien qu'impliqué dans un grand nombre de modalités sensorielles, n'est pas toujours indispensable à la réalisation de tâches reposant sur les modalités sensorielles dans lesquelles il est impliqué (Hong *et al.*, 2018).

Une possibilité est que cette structure soit adaptée, non au traitement primaire de l'information, mais soit apparue, comme c'est quasi systématiquement le cas dans l'évolution, en supplément, et non à la place, de structures préexistantes. Son rôle pourrait alors être d'optimiser l'usage de l'information extraite par les structures sous corticales, permettant d'améliorer le comportement et la perception, d'anticiper les conséquences futures des actions et de l'état de l'environnement, en se basant sur l'expérience passée. En d'autres termes, le cadre à travers lequel pourrait être analysé le traitement général effectué par le néocortex, pourrait être celui du traitement prédictif

de l'information, et de la génération de modèles internes des interactions de l'individu avec son environnement.

Hypothèse du traitement prédictif de l'information sensorielle

Le traitement prédictif de l'information pourrait ainsi être un type de calcul que le microcircuit néocortical serait particulièrement apte à réaliser. Il représente en effet de nombreux avantages, notamment car il permet le déclenchement plus rapide de réponses comportementales appropriées, optimise l'interprétation de données sensorielles bruitées ou manquantes, et permettrait de simplifier le codage de l'information.

Il repose sur le concept de modèles internes qui seraient élaborés dans des régions d'ordre élevé projetant vers les partenaires d'ordre inférieur dont elles prédisent l'activité ascendante. La prédiction serait ainsi générée continuellement basée sur le contexte, l'expérience passée, et la copie du plan moteur en cours (copie efférente, **figure I4 A**). Dans les aires partenaires d'ordre inférieur, recevant de manière descendante cette prédiction, elle serait comparée avec l'information sensorielle ascendante originaire de la périphérie, permettant une comparaison aboutissant à la génération d'une « erreur de prédiction ». Ce signal, nul dans le cas d'une prédiction correspondant parfaitement aux entrées, pourrait être ainsi envoyé vers les aires d'ordre élevé ainsi que les partenaires d'ordre inférieur, permettant de mettre à jour le modèle interne et d'adapter immédiatement le plan moteur.

Le substrat neuronal à ce calcul différentiel dans les aires sensorielles primaires, pourrait correspondre à une circuiterie décrite dans la **figure I4 B**. Le signal ascendant, thalamo-cortical, serait comparé au signal descendant, la prédiction, de manière soustractive, par les neurones pyramidaux de la couche II/III (**figure I4 C**). Dans le cas d'un codage épars, deux circuiteries parallèles impliquant interneurons et neurones pyramidaux permettraient de rendre compte séparément d'une erreur (c'est-à-dire d'une différence signal ascendant - signal descendant) positive ou négative. Cette erreur, correspondant à la « représentation interne » d'un stimulus serait intégrée dans les neurones pyramidaux de la couche V (Keller and Mrsic-Flogel, 2018).

Bien sûr, la mise en évidence expérimentale d'une telle organisation des flux d'informations est très difficile et ce modèle reste très largement théorique. Cependant, des corrélats neuronaux d'une prédiction sensorielle ont d'ores et déjà été mis en évidence dans le néocortex au sein de différentes aires primaires de traitement de l'information sensorielle.

Dans le cortex auditif notamment, cette hypothèse du traitement de l'information a très largement été étudiée, au moyen de protocoles consistant à présenter des séquences répétées de stimulations, puis à introduire des stimuli déviants ou des omissions de stimulations (pour revue : Heilbron and Chait, 2018). Dans de tels contextes expérimentaux, impliquant une récolte « passive » de l'information, la génération de prédiction sensorielle peut dépendre uniquement de l'extraction de liens temporels ou spatiaux entre différents motifs de stimulations auditives.

Avec la démocratisation de systèmes dits de « réalité virtuelle » chez la souris, impliquant leur fixation par la tête sous des dispositifs permettant l'acquisition de l'activité neurophysiologique, le codage prédictif a également été étudié dans le système visuel, en lien avec la locomotion et la navigation (Keller, Bonhoeffer and Hübener, 2012; Fiser *et al.*, 2016; Zmarz and Keller, 2016). La prédiction sensorielle dans de tels contextes implique un couplage entre l'information sensorielle et motrice : les stimulations du champ visuel par une série d'écrans étant couplées à la lecture de la locomotion des souris sur une roue ou une sphère. Durant la locomotion au sein de tunnels virtuels, il a été rapporté que le déclenchement de virages correctifs suite au décalage soudain du flux visuel était affecté par une photoinhibition chronique et instantanée du cortex moteur primaire (M1, Heindorf, Arber and Keller, 2018). Durant ces perturbations, l'activité des neurones des couches II/III et V du cortex M1 était augmentée. Cependant, cette même photoinhibition n'avait que peu d'effet sur le déclenchement de virages spontanés, ayant lieu sans perturbation du champ visuel. Ces découvertes dans le système visuel suggèrent que la détection de perturbations sensorielles requiert la coordination par les aires motrices, en accord avec un possible traitement prédictif de l'information tel que précédemment décrit.

Le système vibrissal tactile des rongeurs, reposant sur la génération active de contacts répétés entre de longs poils faciaux mobiles et l'environnement, est ainsi une modalité sensorielle éminemment sensori-motrice et serait donc particulièrement adaptée à l'étude de la génération de prédictions sensorielles dépendantes du plan moteur. Cependant, potentiellement à cause de la moins grande démocratisation des systèmes de réalité virtuelle adaptés à la modalité sensorielle tactile, la prédiction sensorielle n'a que peu été étudiée dans cette modalité.

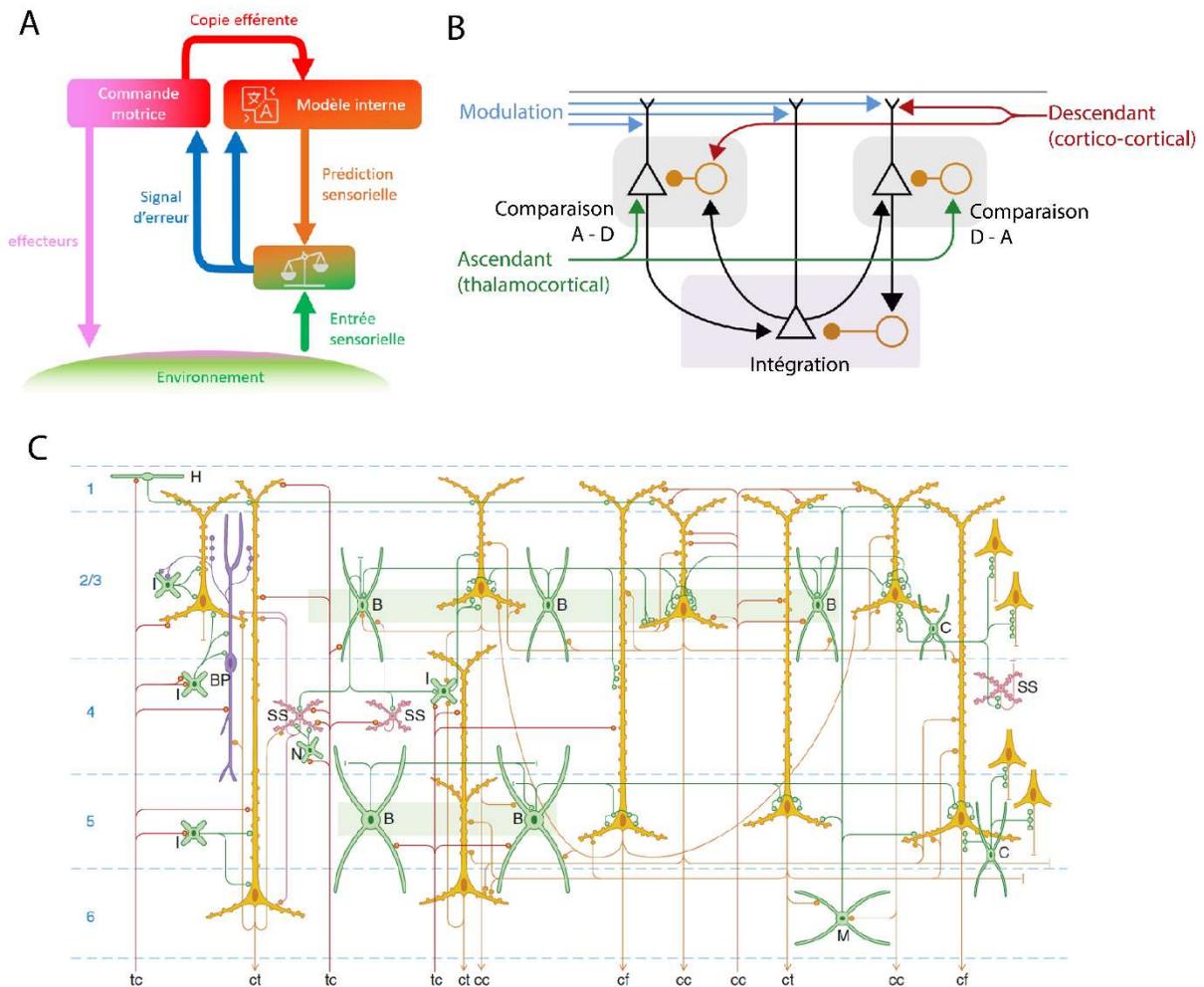


Figure I4 : La micro-circuiterie corticale et le traitement prédictif de l'information

A. Modèle théorique des flux de signalisation dans le cadre théorique du traitement prédictif de l'information sensorielle.

B. Circuit canonique du néocortex décortiqué sous le prisme du traitement prédictif de l'information sensorielle. Les neurones excitateurs et inhibiteurs sont représentés respectivement par des triangles et des ronds (d'après Keller and Mrsic-Flogel, 2018).

C. Schéma représentant les interactions neuronales communes dans le néocortex, par type cellulaire morphologique et couches, dans le néocortex. Les entrées excitatrices sont représentées par des flèches rouges tandis que les projections excitatrices le sont par des flèches jaunes. Les neurones excitateurs sont rouges et jaunes. La connectivité locale inhibitrice est représentée en vert. tc : thalamo-cortical, ct : cortico-thalamique, cc : cortico-cortical, B : cellule en panier, SS : cellule étoilée épineuse, BP : cellule bipolaire, M : Martinotti, C : chandelier, H : cellules cajal-retzius (d'après Kirkcaldie – *Neocortex*, 2012, adapté de Nieuwenhuys, 1994).

Partie II : Le modèle du Système vibrissal de la souris

Une modalité sensorielle à fort couplage sensori-moteur

Le système vibrissal que nous avons choisi pour modèle dans l'étude des processus de traitement prédictif, peut être considéré comme un organe sensoriel tactile, constitué de poils faciaux, les vibrisses, qui génèrent des contacts avec l'environnement (**figure I5 A**). Ces vibrisses sont présentes chez une large portion des mammifères actuels, mais seuls certains taxons, dont les rongeurs font partie, ont développé une capacité motile permettant un balayage actif de ces poils. En contexte exploratoire et de récolte d'informations, la souris effectue un mouvement rythmique d'avant en arrière de l'ensemble des vibrisses à une fréquence comprise entre 5 et 30 Hz, appelé whisking (**figure I5 B**, Jin, Witzemann and Brecht, 2004; Sofroniew and Svoboda, 2015; Voigts, Herman and Celikel, 2015). Chez la souris, une trentaine des plus longs de ces poils, les macro-vibrisses étant communément appelées simplement vibrisses, sont présentes sur chaque côté du nez de l'animal, et mesurent jusqu'à 3 cm. Il existe également une grande quantité de vibrisses plus fines et courtes, les micro-vibrisses, localisées au bout du nez des animaux, rostralement aux macro-vibrisses, et servant particulièrement à la discrimination de critères tactiles fins, de forme ou de texture. C'est pourquoi un parallèle, quoique non démontré, est usuellement dressé, dans lequel les macro-vibrisses sont analogues à notre vision périphérique proche, permettant de scanner rapidement et de manière grossière une large zone, tandis que les micro-vibrisses correspondent à la fovéa dans le système visuel, très résolutive et permettant une étude approfondie des propriétés locales de l'environnement (Brecht, Preilowski and Merzenich, 1997).

Le signal issu des contacts vibrissaux est transduit par une riche population de cellules mécanoréceptrices innervant le follicule vibrissal, à la base de chaque poil (**figure I5 C**). L'amplitude et la direction des déflexions vibrissales y est encodée par ces récepteurs, analogues aux récepteurs cutanés digitaux chez l'humain. Le mouvement du faisceau vibrissal est permis via la présence de petits muscles dits intrinsèques, connectant les follicules vibrissaux au cartilage, et des muscles extrinsèques, connectés à l'os ou au cartilage et au tissu fibreux du faisceau de vibrisses. Au cours du whisking, la protraction vibrissale est permise par la contraction combinée des muscles extrinsèques et intrinsèques, tandis que la rétraction est le résultat de la contraction des muscles extrinsèques et de l'élasticité du tissu composant le faisceau vibrissal (Hill *et al.*, 2008).

Les projections neuronales des mécanorécepteurs de chaque follicule pileux sont transmises par la branche infraorbitale du nerf trijumeau via le ganglion trigéminal, et divergent ensuite en deux voies principales distinctes dans les noyaux trijumeaux du tronc cérébral (**figure I5 D**). La première voie de transmission, nommée voie lemniscale, convoie les informations combinant signaux du contact et relatifs au whisking, permettant supposément de traiter des informations qualitatives relatives aux déflexions, tandis que la voie paralemniscale convoie des informations intégrant les dynamiques multivibrissales et celles du whisking, utilisées afin de former une référence sensorimotrice de la position des déflexions dans l'espace (Diamond *et al.*, 2008; Adibi, 2019). Ces deux voies remontent ensuite dans deux noyaux thalamiques distincts, le noyau ventro-postéro-médian (VPM), reçoit les afférents lemniscaux et le noyau postéro-médian (Po) reçoit les afférents paralemniscaux. L'information dans ces deux voies est organisée somatotopiquement à chaque étage de transmission, dans les noyaux trigéminaux et le thalamus. Enfin, l'information des deux voies converge dans le cortex somatosensoriel primaire lié aux vibrisses (vS1), le cortex à tonneaux précédemment mentionné, décrit par Woolsey et Van der Loos en 1970. La particularité de cette aire corticale réside donc dans la présence d'une correspondance morphologique et fonctionnelle dans les modules corticaux, préférentiellement sélectifs à l'information provenant de leur vibrisse correspondante contra-latéralement (**Figure I5 E**, Woolsey and van der Loos, 1970).

L'organisation des projections neuronales ascendantes dans le cortex à tonneaux est différente pour les deux voies. Les neurones thalamo-corticaux de la voie lemniscale dans le VPM projettent principalement en couche IV de manière modulaire, et en couche Vb/VI de manière plus homogène. Les neurones de la voie paralemniscale du POM projettent eux majoritairement en couche I et Va sans ségrégation visible des arborisations axonales (**figure I5 F**, Staiger and Petersen, 2021).

Lors de contacts vibrissaux, les entrées sensorielles atteignent vS1 en 5 à 10 millisecondes, le cortex somatosensoriel secondaire (S2) avec une latence très légèrement plus importante (Hubatz *et al.*, 2020, figure 3a3) et le cortex moteur primaire (M1) encore une dizaine de millisecondes plus tard (Ferezou *et al.*, 2007, figure 1a). Les informations sensorielles tactiles sont représentées de manière topographique au sein de chacune de ces aires corticales (Ferezou *et al.*, 2007; Hubatz *et al.*, 2020).

Au-delà de cette vision très ascendante du traitement de l'information parfois décrit comme « en lignes dédiées » de nombreuses connections réciproques entre ces structures exercent très

probablement un rôle clé dans la perception sensorielle tactile. Il existe notamment des projections cortico-corticales descendantes provenant du cortex moteur primaire, qui innervent vS1 majoritairement en couche I et Vb, et de manière moins dense en couches II/III et Va (**figure I5 G**, Mao et al., 2011; Lee et al., 2013). Ainsi une copie efférente des commandes motrices, impliquant M1, pourrait être intégrée au sein de S1, mais les mécanismes précis de cette intégration restent à élucider (Hill *et al.*, 2011; Kleinfeld and Deschênes, 2011; Petreanu *et al.*, 2012).

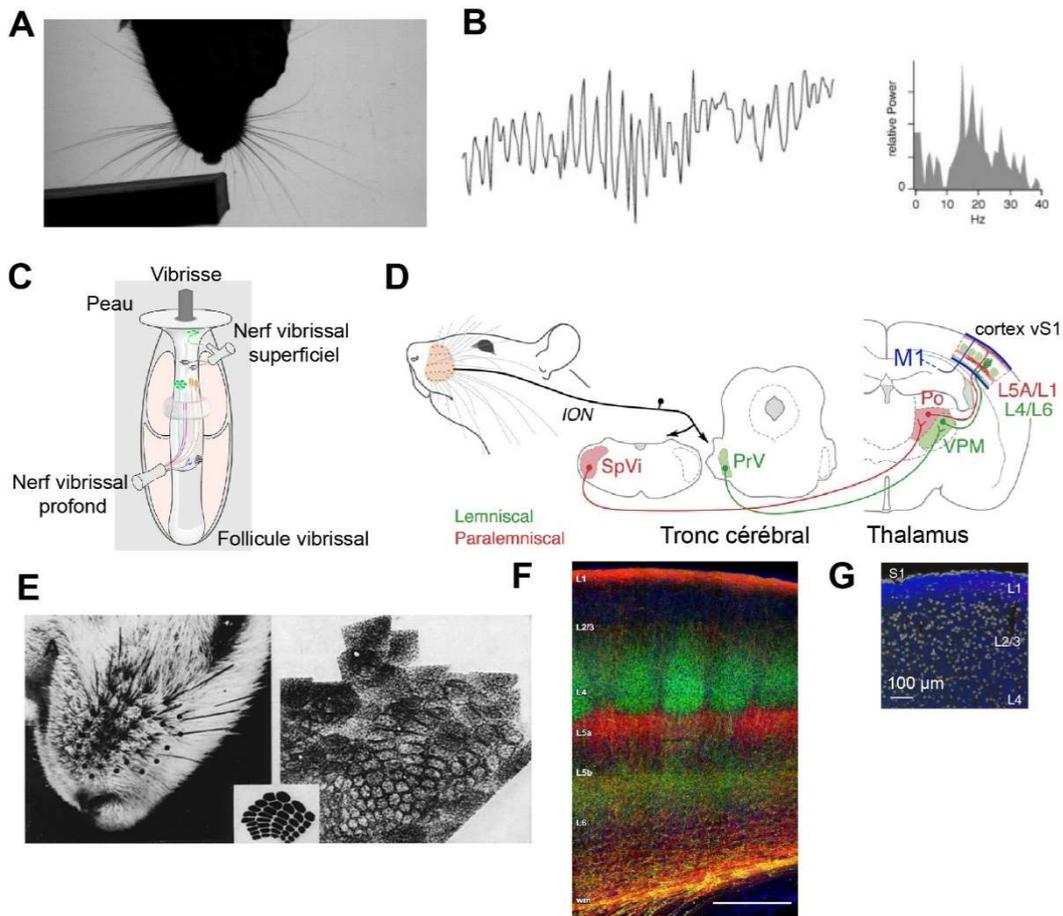


Figure 15 : Le système tactile vibrissal chez la souris

A. Tête et vibrissas de souris en whisking exploratoire à proximité d'un obstacle, vue de manière zénithale, en fort contraste.

B. Dynamiques de whisking chez la souris (d'après Jin et al., 2004).

C. Follicule vibrissal avec ses diverses terminaisons nerveuses (de Takato et al., 2018).

D. Voies de traitement de l'information vibrissale lemniscale (rouge) et paralemniscale (vert, d'après Frangeul, 2014). Les projections depuis le cortex M1 sont affichées en bleu. ION : Nerf trijumeau (infra-orbitaire), PrV : noyau trigéminal principal, VPM : noyau ventro postero median du thalamus, spVi : noyau trigéminal spinal, Po : noyau postero median du thalamus.

E. Organisation spatiale des vibrissas photographiées à gauche, correspond l'arrangement des "tonneaux" observés en coupe tangentielle de cortex au niveau de la couche 4 après coloration de Nissl (Woolsey and Van der Loos, 1970).

F. Projections thalamiques dans le cortex vS1. Les projections du VPM sont colorées en vert, et celles du POM en rouge (d'après Staiger & Petersen, 2021).

G. Projections du cortex M1 vers le cortex S1 (mCherry, modification des fausses couleurs de rouge à bleu, d'après Lee, 2013).

Les souris étant des animaux fouisseurs et nocturnes, passant la majorité de leur temps en milieu obscur, il n'est pas étonnant d'observer un système tactile si développé, leur apportant une portée d'exploration tactile étendue, correspondant à la vision proche. Le cortex vS1 occupe en effet à lui seul environ 20% de la surface du cortex somatosensoriel chez le rat, alors que la surface cutanée représentée par la zone d'implantation des vibrisses est bien plus faible comparativement (Zucker and Welker, 1969).

Pour étudier les mécanismes corticaux impliqués dans la perception sensorielle tactile de nombreuses études ont adopté une stratégie consistant à fixer la tête de l'animal, anesthésié ou éveillé (ce qui facilite les enregistrements neuronaux), et à présenter des stimuli tactiles plus ou moins complexes au niveau des macro-vibrisses relativement faciles à manipuler et à observer. Pour autant, il semble indispensable d'étudier également ces processus dans une configuration favorisant la récolte d'informations sensorielles de manière éthologique et correspondant au comportement dans les situations naturellement rencontrées par les animaux au cours de leur vie.

Or il existe très peu de données relatives l'intégration sensorimotrice dans le contexte d'animaux en comportement libre, collectant des informations tactiles au cours de la locomotion dans un environnement privé de lumière.

Implication de vS1 dans le traitement des informations sensorielles tactiles au cours de la locomotion

Au cours de ces dernières années se sont multipliées les approches expérimentales consistant à développer un environnement dynamique autour de souris fixées par la tête permettant de simuler un environnement évoluant avec la locomotion des animaux. Celles-ci combinées à l'extraordinaire facilitation de l'analyse de la posture des animaux permise par l'avènement de l'utilisation de méthodes basées sur l'apprentissage machine (Mathis *et al.*, 2018), ont permis d'apporter des données sur l'utilisation des vibrisses et le traitement cortical associé (dans vS1) dans le contexte de la locomotion chez les souris.

Il a été montré que certains comportements moteurs dépendant de l'usage des vibrisses pourraient être indépendants des circuits corticaux. Des souris fixées par la tête et courant sur une roue à barreaux ont été mises en présence d'obstacles prenant la forme de barres horizontales, qu'elles ont dû apprendre à enjamber. Les auteurs de ce protocole expérimental

ont montré que les entrées vibrissales tactiles sont très importantes pour estimer la hauteur de l'obstacle et permettre aux souris d'adapter leurs foulées en conséquence (Warren *et al.*, 2021). Cependant, ce comportement était peu altéré chez des souris après lésion de vS1 suggérant que ces adaptations motrices de foulées au cours de la course pourraient reposer sur les circuits d'autres structures.

A l'inverse, il a été montré que le cortex vS1 serait impliqué dans la capacité qu'ont les souris à adapter leur trajectoire de manière à longer les murs au cours de la locomotion (comportement typique chez les rongeurs dit de *thigmotactisme*, **figure I7 A**) (Sofroniew *et al.*, 2014, 2015). Certains neurones du cortex vS1 ont en effet montré une sélectivité au contact avec le mur (17%) alors qu'une autre portion des neurones étaient sélectifs à la distance de passage entre le mur et l'animal (29%). De plus, les animaux n'étaient plus capables d'ajuster leur position par rapport à ces murs lors de l'inactivation transitoire de vS1 par photo-activation des neurones GABAergiques du cortex. Enfin, la photo-activation unilatérale des cellules pyramidales du cortex en l'absence de mur, mimant l'activité induite par des contacts vibrissaux avec celui-ci, était suffisante à provoquer une adaptation du déplacement vers le côté ipsilatéral au côté stimulé, les animaux suivant une trajectoire similaire à celle survenant lors du contact vibrissal avec un objet réel. Ceci suggère que le cortex vS1 participe de manière fonctionnelle à la locomotion guidée par les vibrisses, et qu'il est nécessaire et suffisant à la perception de contacts nécessaires à la réalisation de tels mouvements.

En 2019, Ayaz et associés ont développé un contexte de réalité virtuelle dans lequel les souris ont été placées dans l'obscurité, attachées par la tête et pouvaient se déplacer sur une roue. Un rouleau de papier de verre rotatif et amovible, stimulait les vibrisses des animaux de manière couplée avec leur vitesse de déplacement, mimant le frottement des vibrisses sur un mur au cours de la locomotion (**figure I7 B, haut**, Ayaz *et al.*, 2019). Les auteurs rapportent qu'une importante fraction des neurones du cortex vS1 sont sélectivement activés par le début du contact avec le mur. (plus de 50% dans les couches II/III et V, soit une fraction plus importante que Sofroniew *et al.*, 2015). De manière intéressante, lorsqu'ils découplaient momentanément la vitesse de rotation du papier de verre de celle de la course d'animaux naïfs, certains neurones répondaient sélectivement à cette « incongruence » (**figure I7 B, bas**).

Il est donc clair que le cortex vS1 joue un rôle dans le traitement de l'information vibrissale en contexte de locomotion, et que cette information est immédiatement utile à l'adaptation de ce comportement moteur. De plus, une sous-population de neurones du cortex vS1 semble

sélectivement activée lors de l'introduction d'une déviance entre les informations tactiles entrantes et la commande motrice, observation compatible avec l'hypothèse du traitement prédictif de l'information sensorielle.

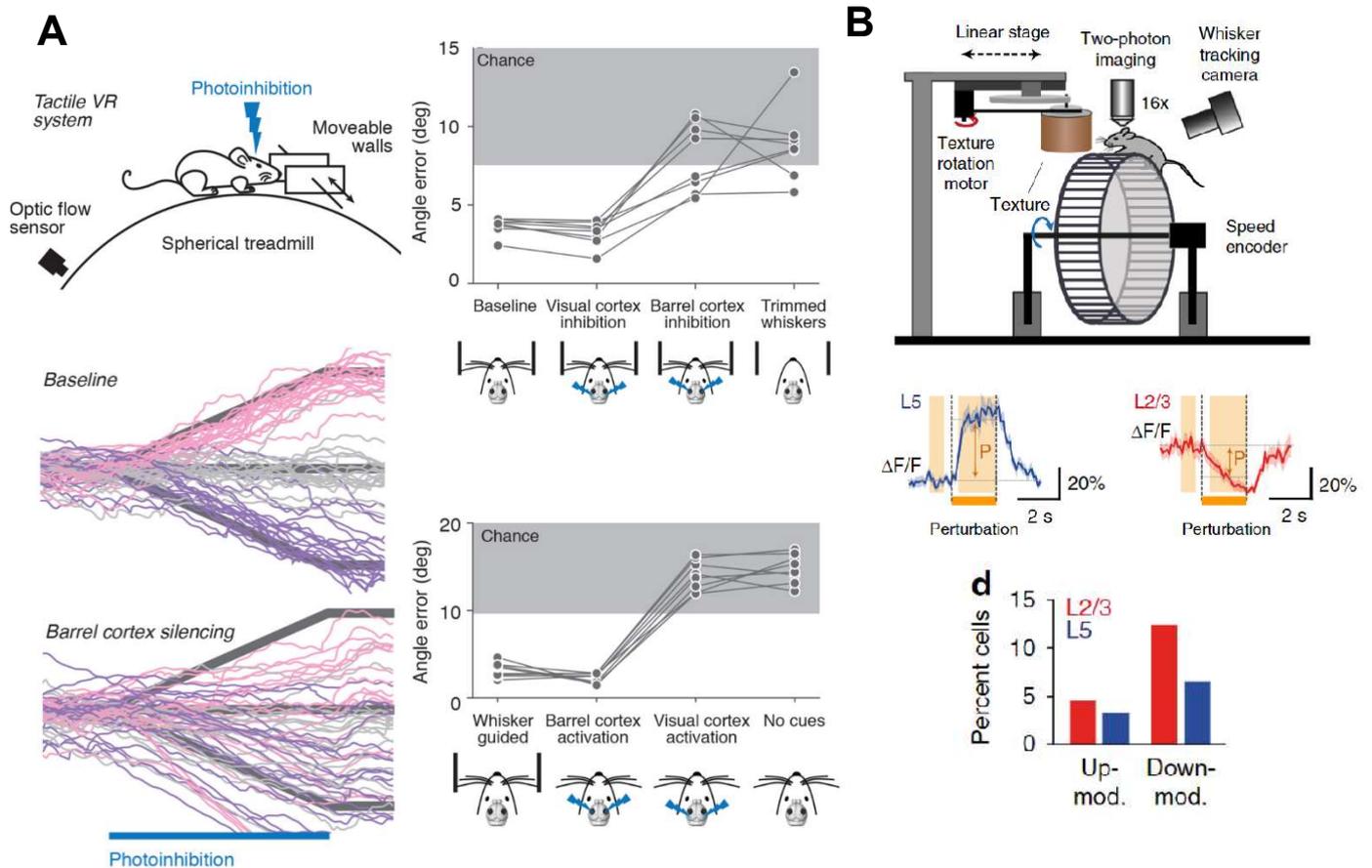


Figure I6 : Traitement cortical de l'information vibrissale en contexte de locomotion

A. En haut à gauche : schéma du dispositif expérimental en réalité virtuelle et des « murs » amovibles. En bas à gauche : trajectoires en fonction du déplacement des murs en condition contrôle (*Baseline*) et lors de la photo-inhibition du cortex (*Barrel cortex silencing*). En haut à droite, déviation par rapport à la trajectoire du mur, en condition contrôle, photo-inhibition du cortex visuel, du cortex S1, et sans vibrisses. En haut à droite, déviation par rapport à la trajectoire standard, en condition contrôle, sans murs mais avec photo-activation du cortex S1, du cortex visuel, et sans murs (Sofroniew et. al, 2015).

B. Haut : schéma du système de réalité virtuelle tactile comprenant un mur rotatif constitué de papier de verre. Ce mur est amovible, et sa rotation est couplée ou découplée de la vitesse de course des souris. Milieu : Traces des variations moyennes d'activité neuronale centrées sur le début de l'incongruence pour une sous population exemple de neurones de la couche II/III en rouge et V en bleu. P témoigne de l'amplitude de la perturbation d'activité induite par l'incongruence, mesurée par la différence d'activité entre les zones jaunes. Bas : Pourcentage de cellules dont l'activité est perturbée par l'incongruence, dans les couches corticales supérieures et inférieures. Augmentation significative de l'activité lors de l'incongruence pour 4.5% des neurones des couches II/III et 3.3% de la couche V. Réduction de l'activité pour 12.4%, des neurones de II/III et 6.6% en couche V.

Partie III : Stratégie expérimentale pour lier comportement libre et lecture de l'activité de vS1

Afin d'être en mesure d'observer les entrées descendantes, reflétant potentiellement l'information de prédiction, provenant des aires d'ordre élevé, ainsi que les signaux d'entrée et d'erreurs supposés respectivement projetés et générés dans les couches II/III, nous avons souhaité disposer d'une mesure capable de rapporter les variations de potentiel de membrane sous liminaires. En effet, l'activité corticale dans le cortex vS1 est connue pour être éparse, et dans le cas d'une comparaison entre signal ascendant et descendant nulle, n'entraînant potentiellement pas de décharge des neurones de la couche II/III, avoir accès à l'activité sous-liminaire est très certainement un atout.

Par ailleurs, il a été montré que des signaux attribués à la prédiction peuvent survenir en avance de phase par rapport à l'information sensorielle ascendante (Fiser *et al.*, 2016). De manière à être en mesure de rendre compte de telles variations de latence de l'information en contexte attendu ou déviant, une fréquence d'échantillonnage proche de la constante temporelle du potentiel d'action est souhaitable.

Ces critères nous ont amené à sélectionner un colorant sensible au potentiel, le RH1691, comme indicateur de l'activité neuronale. Il permet de suivre *in vivo* les variations sous liminaires de potentiel de membrane avec une résolution de l'ordre de la milliseconde (**figure I6 A**, Ferezou, Bolea and Petersen, 2006; Lebeuf *et al.*, 2009).

La manière dont une information déviante par rapport à l'attente sensorielle est traitée au niveau cortical est probablement dépendante de l'expérience et du contexte naturel dans lequel ont été générés ces attentes sensorielles au cours de la vie, façonnant les modèles internes. En outre, dans le cas de la récolte active d'informations vibrissales, la gamme de stimuli récoltés est directement liée à l'éventail de commandes motrices que l'animal est en mesure de déployer.

Nous avons ainsi souhaité étudier le traitement prédictif de l'information dans des conditions permettant de reproduire au plus proche l'acquisition d'informations tactiles par les animaux en conditions naturelles, en permettant donc le libre mouvement des animaux (Parker *et al.*, 2020). Les techniques actuellement disponibles rendant possible le mouvement des animaux

durant l'exploration, et compatibles avec l'imagerie de fluorescence, reposent sur plusieurs types de procédés :

- Les systèmes dits de réalité virtuelle, présentés précédemment, dans lesquels les animaux peuvent se mouvoir sur un référentiel virtuel, tout en étant attachés par la tête permettant l'utilisation de microscopes variés (**figure I7 B**, Hölscher et al., 2005; Leinweber et al., 2014; Sofroniew et al., 2014; Radvansky and Dombeck, 2018; Ayaz et al., 2019). De tels systèmes ont très largement montré leur efficacité dans le cadre de l'étude de la navigation basée sur des indices visuels. Cependant, la mise en place d'une approche comme celle-ci dans le cas d'une navigation reposant sur des indices tactiles est ardue et susceptible de profondément transformer la manière dont les contacts vibrissaux sont effectués comparativement au contexte naturel.
- Les systèmes reposant sur la miniaturisation d'un système d'imagerie directement implanté sur la tête des animaux (**figure I7 C**, Guo et al., 2021; Zong et al., 2022). Bien qu'offrant de nombreux avantages, dans leur grande majorité, ces systèmes souffrent d'une faible cadence d'échantillonnage (20 à 50 Hz).

Nous avons opté pour une troisième approche reposant sur une interface optique multicœur flexible permettant la transmission du signal de fluorescence directement depuis le tissu jusqu'à un capteur statique (**figure I7 D**, Ferezou, Bolea and Petersen, 2006). Ceci permet de profiter de la réelle liberté de mouvement permise par les systèmes embarqués, tout en utilisant un système d'acquisition classique, sensible, permettant de rendre compte des variations de fluorescence de l'ordre de 2% engendrés par le RH1691, et rapide, permettant d'atteindre une fréquence d'échantillonnage de 500 Hz. Rendre compatible cette approche fibrée avec une tâche de comportement où des souris recueillent des informations tactiles vibrissales de manière naturelle sur des périodes prolongées, représentait une difficulté importante liée à la torsion du fibroscope lors des rotations de l'animal. Une partie de mon travail a donc consisté à lever cette limitation.

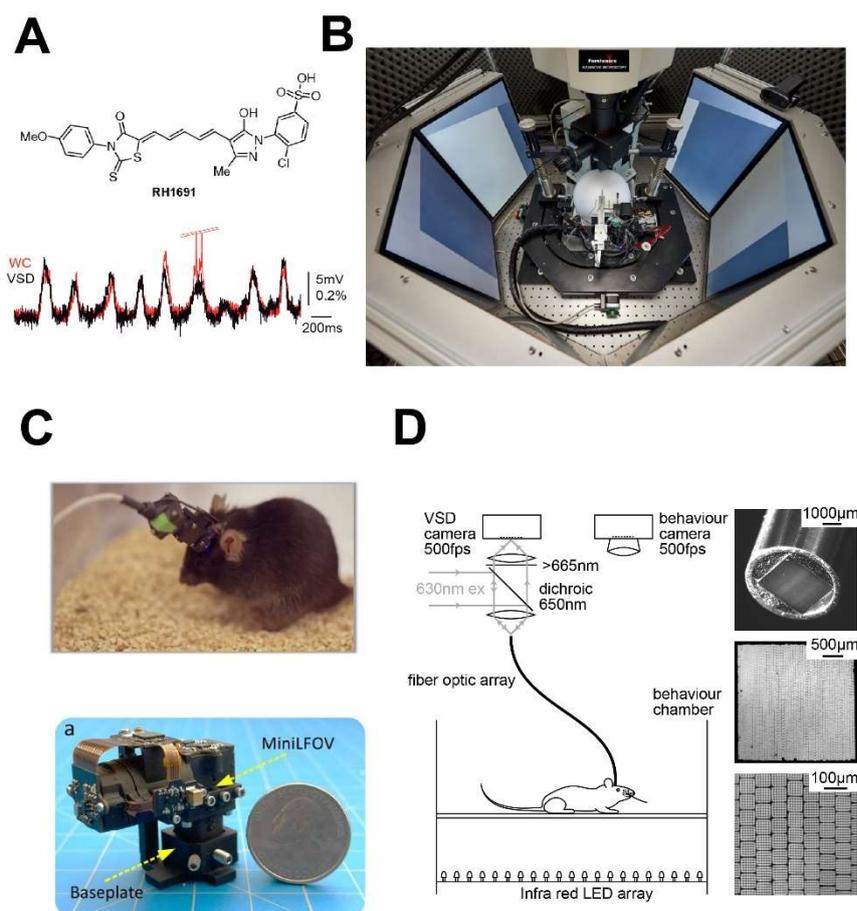


Figure I7 : Solutions technologiques pour l'enregistrement des dynamiques corticales en comportement

A. Structure chimique du RH1691 (*en haut*). Les variations du potentiel membranaire d'un neurone en enregistré en patch clamp cellule entière (rouge) sont fortement corrélés à celles de la fluorescence de la sonde sensible au potentiel RH1691 (*en bas*).

B. Système de réalité virtuelle conçu pour des souris habituées à être fixées par la tête, en dessous d'un objectif de microscope 2-photons (Phenosis JetBall-TFT).

C. Microscope embarqué Inscopix NVista positionné sur la tête d'une souris. Le câble permet la transmission des données d'imagerie sous forme électrique après digitalisation du signal sur le capteur embarqué (*en haut*). Microscope embarqué à champ large (3 mm) permettant l'imagerie dans le cortex et les structures profondes, à l'échelle de la cellule (*en bas*).

D. L'imagerie corticale peut être réalisée chez un animal en mouvement libre au moyen d'une interface fibrée reliant un système optique conventionnel à la tête de la souris (*à gauche*). Les détails du faisceau de fibres optiques sont illustrés à droite (de haut en bas : l'extrémité du faisceau de fibres optiques placé en contact direct avec le cortex ; micrographie de l'interface fibrée composée de 300 x 300 fibres ; image à plus fort grossissement montrant l'arrangement des fibres individuelles assemblées de 6 x 6, d'après Férézou et.al, 2006).

Problématique

L'objectif de mon travail de thèse était tout d'abord de mettre en place les dispositifs expérimentaux permettant d'inciter et de contrôler la locomotion d'animaux dans une arène de comportement.

Il a en parallèle consisté en la mise au point de dispositifs et de procédures expérimentales afin de permettre le couplage du comportement libre et de l'imagerie fibrée de l'activité cérébrale sous liminaire, à l'échelle de la population neuronale et de la milliseconde.

Nous avons profité de ces multiples outils pour mettre en place une tâche de locomotion impliquant l'évitement d'obstacles, en contexte de locomotion libre et guidée par les vibrisses. Cette tâche a permis la génération de prédictions relatives à la position des obstacles, et la possibilité d'omettre la présentation de ceux-ci afin d'étudier le traitement prédictif de l'information.

Dans ce paradigme expérimental, nous avons donc cherché à identifier au sein du cortex somatosensoriel primaire lié aux vibrisses des souris :

- Comment l'activité du cortex sensoriel lié aux vibrisses est-elle façonnée au niveau mésoscopique par les stimuli tactiles avec des obstacles positionnés de manière familière le long la trajectoire des souris ?
- L'absence de stimulation vibrissale attendue suffit-elle à évoquer à l'échelle de populations, une variation d'activité ainsi corrélée à la prédiction de cette stimulation attendue ?

Matériel et méthodes

Animaux

L'ensemble des procédures expérimentales réalisées dans le cadre de ce projet l'ont été en conformité avec la législation Française et Européenne (2010/63/UE) sur l'expérimentation animale après consultation du comité local d'éthique #59 (autorisation n°APAFIS#3561-2016010716016314). Nous avons travaillé avec des souris C57BL/6J mâles et femelles âgées de 6 à 10 semaines au début des expérimentations. Les animaux étaient hébergés à plusieurs dans des cages contenant du matériel d'enrichissement (boîte et papier pour nidation, roue pour exercice et petits jouets changés 2 fois par semaine). Ils étaient soumis à un rythme jour/nuit non inversé de 12 h avec un accès ad libitum à la nourriture. L'accès à un distributeur d'eau n'était pas limité jusqu'au démarrage du protocole de restriction hydrique à partir duquel le poids des souris était mesuré quotidiennement. L'apport hydrique était alors limité à 800 μ L par jour, du lundi au jeudi. Un accès illimité au distributeur d'eau à l'eau était donné du vendredi soir jusqu'au samedi midi, et aucun accès à l'eau n'était possible le dimanche. Tout au long de ce protocole, des quantités supplémentaires d'eau pouvaient être délivrées dans le cas où le poids des animaux constaté descendait en deçà de 80% du poids initial.

Dispositif expérimental pour l'étude des signaux d'attentes chez la souris

Nous avons souhaité étudier les corrélats d'une activité prédictive dans le cortex somatosensoriel primaire lié aux vibrisses (*vSI*) chez les souris, dans le cadre d'un contexte comportemental impliquant un usage éthologiquement pertinent des entrées vibrissales par les souris. Les macro-vibrisses faisant partie des organes sensoriels que les souris utilisent majoritairement lorsqu'elles sont en situation de navigation dans leur environnement naturel dans l'obscurité, il nous est apparu pertinent de mettre en place une tâche de locomotion simple dans laquelle les animaux se servent de leurs vibrisses pour éviter des obstacles. Ces obstacles, dont la détection est importante pour le bon ajustement de la trajectoire des animaux, sont susceptibles d'être attendus et sont donc de bons vecteurs de signaux d'attentes sans entrées périphériques associées lorsqu'ils sont retirés sans que les animaux puissent s'en apercevoir au préalable.

Arène comportementale

Le dispositif comportemental que nous avons mis en place est donc un labyrinthe hémicirculaire (**Figure M1**), dont la conception est basée sur celle de l'arène décrite dans (Kerekes *et al.*, 2017). Le sens du déplacement des animaux dans cette arène est contraint par la présence de portes automatisées se fermant derrière les animaux après leur passage. Leur circulation dans cette arène est incitée par la présence d'un point de distribution d'eau, alors que l'accès hydrique des animaux est restreint (vérification de l'hydratation par maintien à un poids supérieur à 80% du poids initial précédant la mise en place du protocole de restriction hydrique). Le point de distribution d'eau délivre des récompenses d'un volume de 4 à 8 μL selon les protocoles expérimentaux au moyen d'une électrovanne. Il est constitué d'un petit tube dont l'extrémité, située au milieu de l'allée du labyrinthe, est équipée d'un capteur capacitif permettant de détecter les léchages. Il est monté sur un moteur qui permet sa rétraction après collection de la récompense, de manière à éviter que les souris ne restent trop longtemps à proximité du site de récompense. Ainsi, une récompense unique est délivrée lorsque les animaux lèchent ce point de distribution, et l'obtention d'une nouvelle récompense nécessite la réalisation d'un tour complet de l'arène. L'expérimentateur s'assure à la fin d'une journée d'entraînement que chaque animal ait bu 800 μL (en complétant l'apport en eau chez les animaux n'ayant pas reçu cette dose au cours de la tâche).

Les obstacles peuvent être ajustés de part et d'autre de l'allée centrale, selon les besoins du protocole expérimental qui seront précisés dans les parties correspondantes des résultats. Une fois positionnés, ils sont mobiles de manière programmable grâce à une motorisation sur 3 axes (2 rotations (yaw, roll) et une translation sur un axe longitudinal à l'allée centrale). Ceci permet à la fois de régler finement leur positionnement et de choisir de présenter ou non un obstacle à une position répétable, entre deux essais.

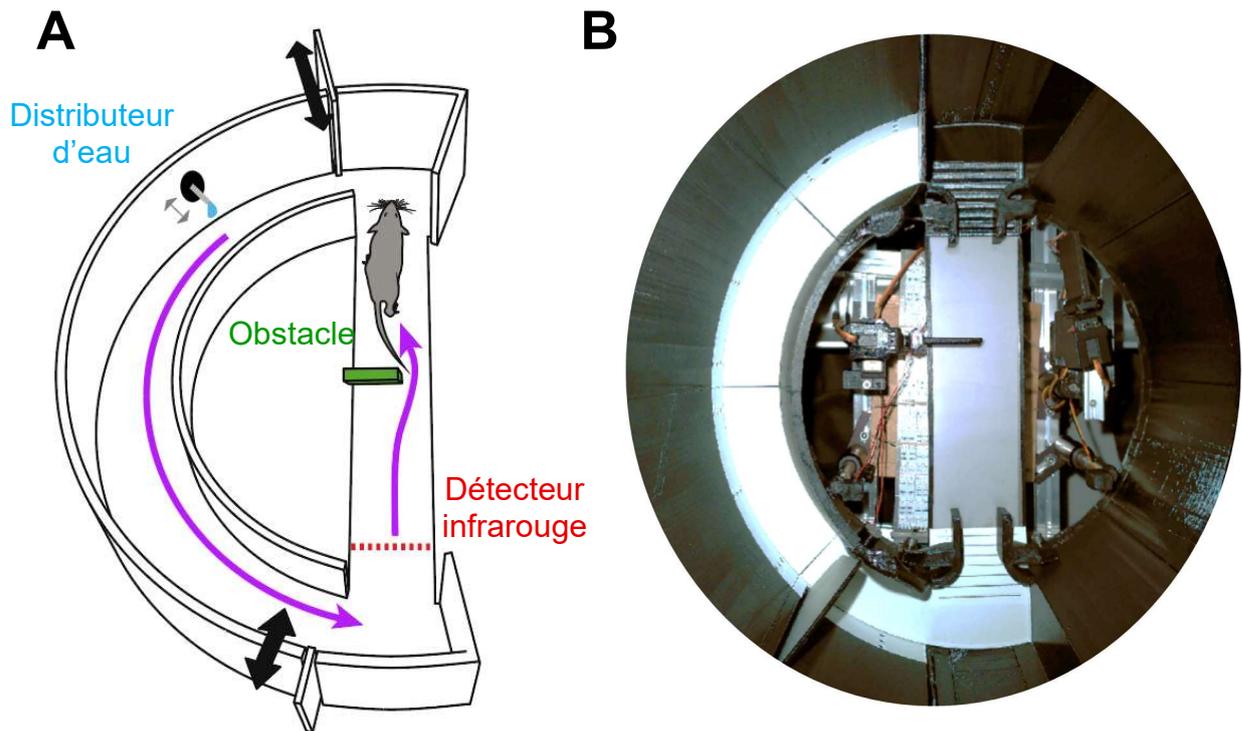


Figure M1 : arène comportementale.

A. Schéma de l'arène comportementale. Les flèches noires à double sens symbolisent les mouvements des portes. Les flèches violettes symbolisent la trajectoire et le sens de passage des souris dans l'arène. La ligne rouge pointillée dans l'arène représente la localisation du détecteur infrarouge déclenchant l'acquisition d'images par les caméras rapides d'imagerie du comportement et d'imagerie corticale.

B. Photo illustrant l'organisation réelle de cette arène.

Ces changements de position entre les essais se font uniquement alors que les deux portes sont closes et que les animaux sont en train d'obtenir une récompense dans le bras latéral de l'arène. Afin d'éviter que les animaux ne puissent associer le son des moteurs à la configuration des obstacles, une série de 4 mouvements, dont l'intervalle temporel et la position cible sont aléatoires (200 à 600 ms entre deux commandes de mouvement), précèdent le mouvement de mise en configuration choisie des obstacles pour l'essai à venir.

Le couloir circulaire extérieur est bordé de murs tandis que l'allée droite en est exempte, de manière à ce que les contacts vibrissaux ne puissent avoir lieu qu'avec le sol ou les obstacles dans cette partie de l'arène. Celle-ci est suspendue à une hauteur de plus de 40 cm du sol, de manière à empêcher les souris de quitter le parcours, ces animaux ne s'aventurant pas à sauter dans des espaces vides dont ils ne peuvent toucher le fond à l'aide de leurs vibrisses.

L'ensemble de l'arène et des dispositifs indispensables à l'expérimentation sont intégrés à une armature en profilés aluminium (THORLABS) produisant un volume de 50 x 50 x 200 cm. Cette armature est intégralement couverte d'un rideau noir occultant, refermable à l'aide de système « scratches » de manière à prévenir toute entrée de lumière dans l'arène comportementale durant les expérimentations. Tous les dispositifs produisant de la lumière (témoins LED de fonctionnement par exemple) à l'intérieur de l'armature sont couverts d'un revêtement noir autocollant fortement absorbant. De ce fait, la mise à jour des informations de navigation dans l'arène et l'allée centrale en présence des obstacles est estimée être principalement le résultat d'indices tactiles cutanés et vibrissaux, ou olfactifs. Afin de minimiser les indices apportés par cette seconde modalité, les obstacles et la totalité des surfaces de l'arène comportementale sont nettoyés et frottés entre chaque session avec de l'éthanol (70%).

L'ensemble des capteurs et actuateurs sont contrôlés via un ensemble de dispositifs électroniques agencés à façon, pilotés par un microcontrôleur sur carte de développement Arduino Méga 2560.

La communication de ce microcontrôleur avec les ordinateurs s'effectue via un nœud traitant les données en entrée SERIAL/COM et servant celles-ci via le protocole TCP/IP (Python). Ce microcontrôleur est dynamiquement paramétrable au cours et entre les sessions, via une interface graphique développée à façon (Python, PyQT) s'interfaçant avec le nœud TCP/IP permettant d'ajuster les paramètres expérimentaux. L'ensemble des données des actuateurs et

capteurs produit lors d'une session est automatiquement sauvegardé via une connexion entre ce même nœud et une base de données (MySQL).

Le suivi du déroulement des sessions est effectué avec une caméra IP (DALSA Genie Nano, 30 Hz), intégrée avec l'interface graphique via un second nœud TCP/IP (utilisant la librairie GENICAM Harvesters <https://github.com/genicam/harvesters>) permettant la visualisation en direct, et la sauvegarde des données sur disque. L'illumination de l'arène à destination d'observation par cette caméra est effectuée via un couple de deux projecteurs (960 nm) et l'objectif de cette caméra est équipé d'un filtre passe haut (évitant toute pollution par les sources d'émission à 850 nm dans l'arène).

Imagerie rapide du comportement

Le sol de l'allée droite de l'arène est translucide aux infrarouges proches et permet ainsi de disposer un système d'illumination homogène (longueur d'onde 850 nm) sous cette l'allée. Ceci permet d'obtenir des images en fort contraste du profil des animaux, y compris de leurs vibrisses, tel qu'illustré sur la **figure M2** ci-contre. Une caméra sensible aux infrarouges proches, (BAUMER HXC20)

positionnée de manière zénithale à cette allée permet de suivre le comportement des animaux à une fréquence d'échantillonnage de 500 Hz. L'acquisition de ces images est déclenchée lors du passage de la souris devant un détecteur infrarouge (IR Break Beam Sensor Adafruit) situé à l'entrée de l'allée centrale, et effectue une acquisition d'une seconde, durée généralement

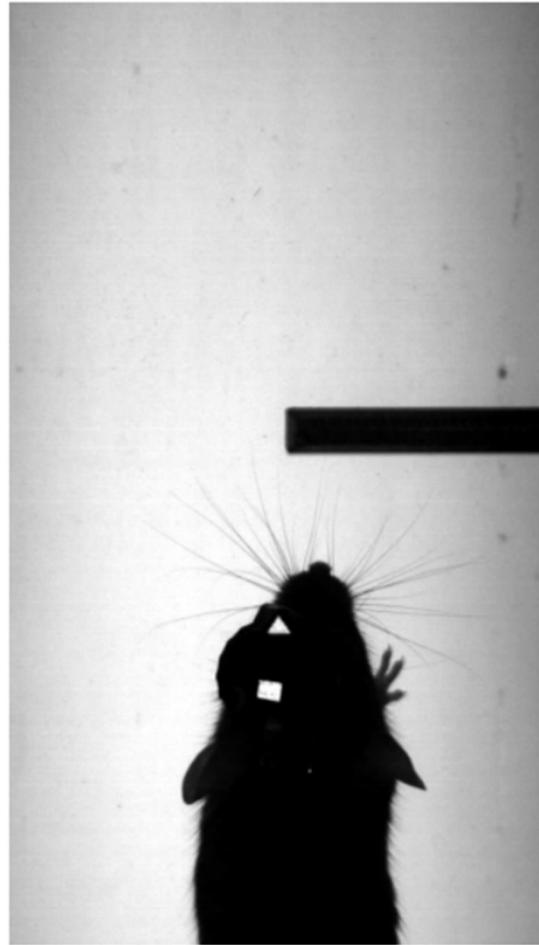


Figure M2 : imagerie du comportement

Image capturée dans l'allée centrale avec la caméra rapide BAUMER et le rétroéclairage infrarouge. Le corps de la souris est clairement détourné, et ses vibrisses sont visibles. Les deux formes, triangulaires et rectangulaire, sur sa tête sont les marqueurs rétro-réfléchifs fixés sur l'implant et permettant un suivi précis de la position de la tête et de son orientation. Un obstacle présent à gauche est visible en face de la souris, et est orienté de manière à être parfaitement perpendiculaire au plan focal de la caméra, facilitant le discernement des vibrisses au contact de cet obstacle.

suffisante à ce que les animaux traversent la quasi-totalité de cette allée (Système d'acquisition : R&DVision).

Cette allée rectiligne est fabriquée avec une base structurelle rigide de plexiglass transparent d'1 cm d'épaisseur sur laquelle est fixée une couche de 5 mm d'épaisseur de Polydimethylsiloxane (PDMS), de manière à la rendre moins glissante, transparente et mate

Mise en place d'une approche fibrée pour l'imagerie de l'activité du cortex vS1 chez l'animal libre de ses mouvements

Faisceau de fibres optiques pour l'imagerie en comportement

Afin d'être en mesure d'observer des signaux d'activité corticale chez les souris engagées dans la tâche de locomotion décrite précédemment, nous avons opté pour une solution dite « d'imagerie fibrée ». Cette solution repose sur l'utilisation d'un guide d'image de 90 cm de long composé de multiples fibres agencées en matrice cohérente d'un bout à l'autre du faisceau, permettant ainsi la transmission d'images. Ce faisceau de fibres optiques (SCHOTT Wound Fiber Bundle) est ainsi composé de 600 x 600 fibres individuelles. Une particularité de ces faisceaux est que les fibres individuelles ne sont collées ensemble que par petits groupes de 6 x 6 le long du guide. Ces petits éléments sont assemblés de manière cohérente uniquement à leurs extrémités, ce qui confère une grande flexibilité au guide d'image.

L'extrémité dite proximale du guide d'image, à l'interface avec l'objectif de la caméra d'imagerie, est montée sur un axe rotatif motorisé (voir chapitre concernant le joint optique rotatif pour plus de précision) afin de minimiser la torsion du faisceau de fibres durant la locomotion des animaux. Cette extrémité proximale dispose de deux chanfreins permettant la localisation concentrique répétée de la fibre dans son logement. La concentricité du logement en lui-même peut être si nécessaire réglée de manière à ce que l'axe de rotation du faisceau de fibres soit aligné avec le centre du capteur de l'image, à l'aide de 2 x 3 vis radiales espacées de 120°.

L'extrémité distale du guide d'image est de taille réduite, permettant la fixation sur le crâne des souris à l'aide d'implants conçus à façon.

Implant permettant une fixation rapide et ajustable du fibroscope

Un implant a été spécifiquement conçu (outil logiciel : SolidWorks, impression 3D titane : Sculpteo) afin de permettre la fixation et le retrait rapide et répété du faisceau de fibres optiques, tout en permettant un degré d'ajustement du positionnement de ce faisceau par rapport au cortex des animaux. La fixation du guide d'images à l'implant est possible grâce à l'assemblage des éléments illustrés dans la **figure M3**.

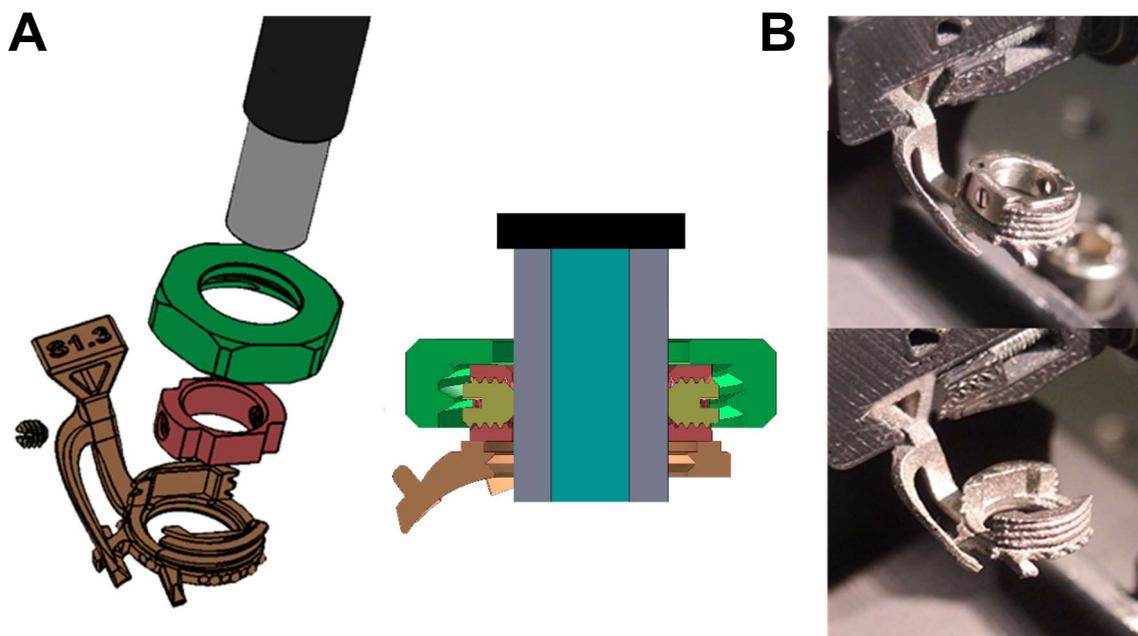


Figure M3 : Implant permettant la fixation du fibroscope

A. Composants du système de fixation du fibroscope à l'implant en vue explosée (*à gauche*) et en position réelle, en coupe (*à droite*). La partie distale du faisceau de fibres (*gris/cyan*) est ajustée et fermement fixée à l'implant (*marron*) au moyen d'un écrou de serrage (*vert*) qui comprime l'anneau d'ajustement de profondeur (*rouge*) dans l'implant. L'anneau d'ajustement est fixé à la partie distale du faisceau de fibres par le serrage d'une des deux vis sans tête M2 (*jaune*).

B. Photos de l'implant, attaché dans une fixation par sa partie en queue d'aronde et contenant l'anneau d'ajustement avec une vis sans tête (*haut*) et sans l'anneau (*bas*) laissant apparaître les ouvertures latérales permettant d'accéder au crâne pour effectuer des opérations chirurgicales.

L'implant est fixé sur le crâne des animaux à l'aide de colle cyanoacrylate et de ciment chirurgical. Sa base présente des aspérités prévues pour augmenter la surface de contact et le maintien entre le ciment et l'implant. L'implant présente en son centre une ouverture ronde qui permet d'accéder au crâne une fois l'implant fixé aux animaux.

Deux ouvertures latérales dans le filetage de l'implant permettent également d'accéder au crâne avec des outils chirurgicaux afin de réaliser une craniotomie après l'implantation. Enfin, l'implant peut être accroché à un support par une queue d'aronde, afin de faciliter les interventions nécessitant que les animaux soient fixés par la tête. Typiquement, les souris étaient ainsi fixées par leur implant durant une à deux minutes avant chaque session d'entraînement avec le fibroscope, le temps de procéder à la fixation de la partie distale du guide d'image dans l'implant, avant d'être placées dans l'arène.

L'extrémité distale du faisceau de fibres peut se voir attacher une seconde partie du système de fixation, un anneau, rendu solidaire de manière ajustable à l'aide d'une vis de serrage radiale. Celle-ci nécessite d'être serrée après avoir « enfilé » au préalable un écrou libre sur le faisceau de fibres. Cet anneau va se loger dans l'implant et le serrage de l'écrou libre sur le filetage de l'implant permet de compresser l'anneau entre le fond de l'implant et le haut de l'écrou, l'anneau étant légèrement plus haut que les parois filetées de l'implant, permettant ainsi un serrage rigide.

Dispositif rotatif pour l'imagerie fibrée chez l'animal éveillé

Utiliser une telle approche d'imagerie corticale fibrée chez des animaux réalisant une tâche comportementale impliquant des rotations successives dans une même direction nécessitait de trouver une solution technique permettant de s'affranchir des problèmes liés à la torsion du faisceau de fibres optiques susceptible d'exercer une contrainte importante sur la mobilité des souris. Or la résolution de cette problématique reste peu adressée pour l'imagerie fibroscopique, tant dans la littérature scientifique, que dans les dispositifs commerciaux disponibles.

C'est pourquoi j'ai développé un joint optique rotatif motorisé (MORJ), peu coûteux, capable de résoudre le problème de torsion du fibroscope et d'adopter plusieurs modes d'opération pour répondre aux besoins de diverses méthodes d'imagerie et protocoles comportementaux.

L'article ci-dessous, soumis à publication dans une revue scientifique à comité de lecture, décrit de manière exhaustive ce dispositif, montre son impact sur la mobilité des animaux, et illustre son utilisation pour l'imagerie sensible au potentiel chez des souris engagées dans une tâche de locomotion guidée par les vibrisses.

Le mode principal, dit « en séquence » décrit dans cet article a été utilisé pour l'acquisition des données d'imagerie fibrée sensible au potentiel au cours de ma thèse.

Imaging the brain in action:

A motorized optical rotary joint for wide field fibroscopy in freely moving animals

Timothé Jost-Mousseau, Max Chalabi, Daniel E. Shulz, and Isabelle Férézou.

Institut des Neurosciences Paris-Saclay (NeuroPSI), Université Paris-Saclay, Centre National de la Recherche Scientifique, Saclay, France.

Corresponding author: isabelle.ferezou@cnrs.fr, phone: +33 1 69 82 34 02.

¹Institut des Neurosciences Paris-Saclay (NeuroPSI), Université Paris-Saclay, CNRS, Centre CEA Paris-Saclay, Bâtiment 151, 91400, Saclay, France.

Funding

CNRS, Fondation pour la Recherche Médicale, Agence Nationale pour la Recherche (Expect, Neurowhisk), Lidex Neuro-Saclay (BRAINSOPES, iCode), Région Ile de France (DIM Nano-K, ML02 Neurofib).

Acknowledgements

Experimental assistance and technical expertise were provided by Aurélie Daret, Tony Delobel, Guillaume Hucher and Patrick Parra. We thank Jozsua Fodor (Ymetry) who has given precious advice for the design of the head implant. We are grateful to Anne-Cécile Nguyen, Anouchka Nogatchewsky, Yohan Guehenneux, Nicolas Khefif and Mathilde Cazaubieilh for contributions to the development of the behavioural setup and experiments. We warmly thank Henri Lassagne, Sophie Hubatz, Valérie Ego-Stengel, Luc Estebanez, Matias Goldin, Evan Harrell and Cathie Ventalon for helpful feedback and discussions throughout the project.

Declaration of interests

T. J-M. and I.F. are inventors in accordance with FR patent #2103848, owned by the Centre National de la Recherche Scientifique. All other authors declare no competing interests.

Keywords (max 6)

- ♦ Optical rotary joint
- ♦ Mesoscopic functional imaging
- ♦ Cerebral cortex
- ♦ Freely behaving animals
- ♦ Voltage sensitive dye imaging.
- ♦ Inertial Measurement Unit

Highlights 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point)

- ♦ We developed an active rotary joint for fibroscopic imaging in freely moving mice
- ♦ The animal's orientation is measured by an embedded inertial measurement unit
- ♦ The joint can either follow animal's orientation or be fixed in arbitrary positions
- ♦ It can be adapted to a wide range of optical and behavioural experimental designs

Author contributions

Timothé Jost-Mousseau: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Writing - Original draft preparation. **Max Chalabi:** Investigation, Methodology, Writing - review & editing. **Daniel E. Shulz:** Conceptualization, Funding acquisition, Resources, Supervision, Validation, Writing - review & editing. **Isabelle Férézou:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Validation, Writing - review & editing.

Abstract

Our understanding of the neuronal processes governing behaviour is boosted by the constant development of technological strategies allowing the optical recording of large neuronal assemblies in awake behaving mice. Nowadays, the most common approaches consist in using either miniaturised microscopes directly mounted on the head of the animals, or sophisticated closed-loop virtual reality systems operating around mice accustomed to being firmly fixed by the head below cutting-edge optical imaging systems.

The former limits the quality of the recorded signals due to the constraints in size and weight of the optics required for their portability, the latter suffers from the restriction of the movement repertoire of the animal and the quality of the virtual environment, which hardly reproduces the complexity of natural multi-sensory scenes.

Another strategy which takes advantage from both approaches consists in the use of a fibre-bundle interface to carry optical signals from a moving animal to a conventional imaging system. However, as the bundle is usually fixed below the optics, its torsion resulting from rotations of the animal inevitably constrains the behaviour over long recordings. To overcome this major limitation of fibroscopic imaging, we developed a motorized optical rotary joint.

Here we show its principle of operation, demonstrate its efficacy in a locomotion task, and propose several modes of operation for a wide range of experimental designs.

1. Introduction

Unravelling the links between neural activity and behaviour is a major challenge to progress in our comprehension of the normal and pathological functioning of the central nervous system.

During the last two decades, the tremendous expansion of the molecular toolbox allowing to probe (Grinvald and Hildesheim, 2004; Inoue, 2021; Kim and Schnitzer, 2022; Knöpfel, 2019; Lin and Schnitzer, 2016) and control (Deisseroth, 2015) neuronal activity with light (Emiliani et al., 2015; Knöpfel et al., 2010) has fostered the development and use of “opto-physiological” techniques in integrative neurosciences. This has been accompanied by an intensification of the use of the mouse as a model system, as it facilitates the implementation of these molecular tools and offers a rich repertoire of behaviour. Meanwhile, a constant effort has been made to push forward optical methods, in quest for a better resolution in space and time, on ever wider fields of view.

Altogether, these technological means that one could gather under the term “opto-physiology”, are complementary to electro-physiological approaches and offer comparatively some incremental advantages, such as their insensitivity to electro-magnetic disturbances or the ability to reduce tissue invasiveness in the outermost structures of the brain. The major strength of methods based on genetically encoded probes or actuators is to enable the identification of the source of activity in the neural tissue. On the other hand, synthetic voltage sensitive (VSD) probes are to date the most potent means to measure ensemble neuronal activity with high temporal (down to 1 ms) and spatial (<50 μm) resolution over large fields of view (Chemla et al., 2017).

The development of these opto-physiological approaches has rapidly raised the question of coupling optical recording or patterned photo-stimulation with the performance of complex behavioural tasks in mice. Currently, three main experimental strategies have been adopted to deal with this issue:

The first one consists in training mice to be held firmly by their head under sophisticated optical systems. This condition restricts though the behavioural repertoire under study. Head fixation is indeed a strong constraint when designing protocols to interrogate how central neuronal networks predict and integrate sensory information or generate motor commands on the basis of environmental cues and prior experiences. This difficulty has been partially addressed through the implementation of computer-controlled closed-loop “virtual reality” environments around the head-fixed mice standing on a spherical (Dombeck et al., 2010; Hölscher et al., 2005) or linear (Ayaz et al., 2019; Poort et al., 2015) treadmill. Their locomotion can be monitored in real-time to dynamically affect screens (Dombeck et al., 2010; Hölscher et al., 2005), actuators (Ayaz et al., 2019; Sofroniew et al., 2014), or other means (Radvansky and Dombeck, 2018), simulating an environment that changes accordingly by stimulating different sensory modalities. Note that simpler systems have been implemented, using only the mechanical forces produced by the animal motility to update its environment, such as an air-lifted mobile cage (Kislin et al., 2014) or a treadmill consisting of a long belt containing both visual and tactile cues (Royer et al., 2012). All these approaches allow to use the entire range of cutting-edge optical methods and provide great control over the experimental paradigm by reducing degrees of freedom of the experimental subject and its sensory environment (Dombeck and Reiser, 2012). However, the richness of behaviours that can be studied, and the fidelity of sensory stimulations compared to the real-world experience of the subject do not cover the huge parametric space of natural conditions. Furthermore, the physiological bases of some neural functions such as those involving the vestibular system, social interactions, or prey capture (Hoy et al., 2016) can hardly be studied in this framework.

A second strategy relies on the use of miniaturized optical devices embedded on top of the mouse's head (Yu et al., 2015; Ziv and Ghosh, 2015). Most of these devices are one-photon optical systems which require

only electrical connections for power supply and data collection. Hence, they permit real mobility of the animal, which can be optimized simply through the use of a slip ring electrical commutator. Such mini-one-photon microscopes enable optical imaging from the cellular scale in the cerebellar cortex and deep subcortical structures (Cai et al., 2016; Ghosh et al., 2011; Ziv et al., 2013), up to the mesoscopic scale over the whole dorsal part of the cerebral cortex (Rynes et al., 2021). They can further incorporate a light source for bulk opsin photo-activation (Stamatakis et al., 2018). Recently, a portable digital micromirror device (DMD) has been implemented on a one-photon mini-microscope to allow patterned opsin photo-activation (Zhang et al., 2021) in freely moving mice, but this device requires an additional optical fibre for light delivery to the DMD. In the line of the development of miniaturized one-photon microscopes, efforts have been made to assemble mini-multi-photon microscopes that can be mounted on the head of freely-moving mice (Klioutchnikov et al., 2022; Zong et al., 2022). However, in addition to electrical connections, these systems also require the use of an optical fibre to bring the excitation laser beam to the imaged surface, and, for one of those, an image guide (tapered fibre bundle) to collect the emitted photons. These optical cables constitute an extra difficulty to allow the mice to navigate and rotate freely in their environment. In essence, embedded optical systems often suffer from the miniaturization process in terms of quality of the output signal of the device, while representing a fairly large mass and volume compared to the size of a mouse.

The third approach consists in the use of optic-fibre bundles, made of arrays of individual fibres packed together to transfer a spatially organized optical signal between the animal and an optical system that can remain static. This approach benefits from advantages of the two previous ones. On the one hand the possibility to use any kind of sophisticated and bulky optical systems, and on the other hand, to allow a real mobility of the animal. However, these are gained at the cost of a spatial discretization of the optical signal which depends on the number of individual fibres present in the bundle. As for miniature microscopes, this is a rapidly evolving field, which has proven its potential for optical imaging of neuronal activity both at the mesoscopic scale in the cerebral cortex (Ferezou et al., 2006), at the cellular scale in subcortical structures (Dussaux et al., 2018; Ozbay et al., 2018), and for multisite photometry (Kim et al., 2016; Sych et al., 2019) in freely moving mice. Such fibroscopic approach has also been used successfully to apply patterned photoactivation at the cellular scale in freely moving mice (Szabo et al., 2014).

In the same way as for the recently developed miniaturized 2-photon microscope mentioned above, these methods rely on a bundle of optical fibres, which accumulates torsion as rotations of the animal increase, therefore constraining the behavioural protocols under study. Unlike for electrical signals where rotary joints are very commonly used to address this issue, the rotative

unaltered transmission of coherent optical signals still remains a challenge.

To solve this problem, we have developed a robust and relatively inexpensive motorized optical rotary joint that can be either coupled in real-time to the rotation of the animal's head by means of an embedded inertial measurement unit, or locked at will in front of the image acquisition system. In doing so, it advantageously allows combining optimization of the animal's mobility with best imaging performances. Here we describe this device and illustrate its use for VSD imaging of cortical activity in the barrel cortex of mice engaged in a whisker-guided locomotion task. Moreover, the optical rotary joint can be used in different operating modes, which should offer optimal use for a wide range of imaging methods and behavioural tasks.

2. Methods

2.1. Apparatus

In order to enable fibroscopic neuronal imaging in freely behaving mice with minimal movement restrictions, we have implemented an active rotating optical interface which can follow any kind of user commands, or more specifically match the absolute orientation of the animal computed in real time (**Fig. 1A-C**).

Optical imaging is achieved through a 90 cm-long coherent fibre-bundle interface (Schott AG, wound fibre bundle, 0.6 numerical aperture) which is fixed to the animal's head by means of a custom designed head implant (0.8 g, Titanium, 3D printed by Sculpteo, **Fig. 1C, right**).

Importantly, the head implant design allows the fixation, on the mouse of a small 9 degrees of freedom Inertial Measurement Unit (IMU, InvenSense ICM20948, **Fig. 1B1**). This IMU comprises a magnetometer, which is key to correct accelerometer and gyroscope error accumulations over time.

The distal end of the fibre-bundle is inserted into the animal's head-implant at adjustable depth. The fibre-bundle itself (**Fig. 1B2**) is composed of 600 x 600 individual 8 μm -core fibres covering a 2.5 x 2.5 mm surface which can guide an image from one extremity to the other. The fibre elements are patched together by 6x6 along their total length and these patches are assembled only at the extremities of the fibre-bundle, giving it an increased flexibility compared to bundles where all the single fibre elements are glued together along their entire length.

The proximal end of the fibre-bundle is fixed inside a custom designed optical rotary interface (**Fig.1 B3**) (manufactured by JGB SARL), which allows it to rotate relatively to the optical elements (THT Macroscope, SciMedia Ltd) and image sensor (MiCAM Ultima, SciMedia Ltd., 100 x 100 pixels sensor, 16bit depth mono, **Fig.1 B4**). The rotary interface can be finely positioned on a 2D plane relative to the image sensor with the aid of a 2D translation optic mount (**Fig.1 B5**).

The data from the IMU are transmitted at 50 Hz sampling rate through 4 ultra-thin shielded wires (AWG 36 BTA-3607.04 Industrifil France) and an electrical rotary interface (**Fig. 1B6**, Jinpat, PT038-0605 - 6 contacts 5 Amperes) to a custom designed controller (**Fig.1 B7**,

Comprising, PJRC Teensy4.0, Arduino Mega 2560 boards and Trinamic TMC2209 stepper driver).

With the inertial measurements received every 20 ms, the controller computes the absolute orientation of the mouse's head (yaw component) based on a C++ implementation of the Madgwick orientation filter (Madgwick, 2010). This variable is then used to rotate a stepper motor accordingly (Fig. 1B8, 42BYGHM809 – 400 physical steps/rev, set at x8 micro-stepping). The motor in turn transmits the rotation to the rotary interface by means of a timing belt (Fig. 1B9). The belt is tensioned to minimize mechanical backlash, and is set-up in a 1:3 gear-ratio configuration, increasing output torque to cope with high acceleration rates. A full revolution of the main shaft can thus be subdivided in 9600 individual motor steps, allowing to minimize vibrations and noise generation by smoothing out motion.

2.2. Operating mode

We have implemented a mode of operation which ensures acquisition of high-speed high-quality short sequences of images, and allows to compensate for any torsion of the fiberscope due to the mouse rotation

between two consecutive sequences of image acquisitions. We refer to this mode of operation as *hardware registration* (HR).

Prior to each acquisition, a lock-trigger causes the motor to rapidly reach and maintain an optimal reference orientation (OREF) during the whole sequence. This is the orientation where the largest area of the sensor is filled by the square fibre-bundle imaging field (Fig.1D left), thereby ensuring that the highest possible target area and spatial resolution is accessible during the whole sequence.

At the end of the image acquisition sequence (sequences duration depends on user parameters, which were set to 1 second in our case), the rotary joint is released, the motor rotates to match the orientation of the animal's head as computed from the IMU data, and continues following in real-time its orientation until the next acquisition sequence (Fig.1D right). These non-acquisition epochs will be referred in this article as *follow* epochs.

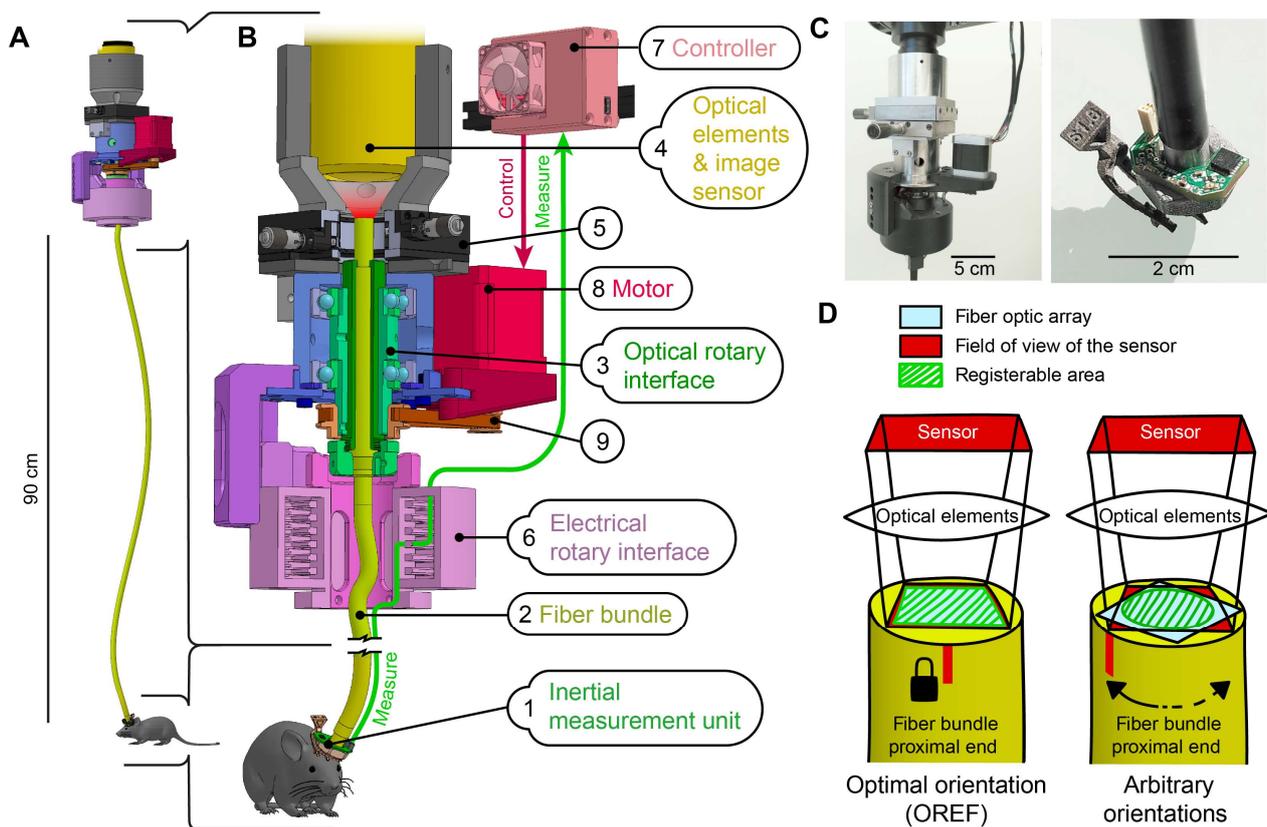


Fig. 1. Motorized rotary optical interface coupled to target's absolute orientation.

(A) Schematic representation of the device in its real proportions. (B) Detailed diagram of the apparatus assembly. 1: IMU, 2: fibre-bundle, 3: optical rotary interface, 4: optical elements and image sensor, 5: 2D translation system for fine adjustment of the fibre-bundle proximal end relative to the sensor, 6: electrical rotary interface, 7: controller, 8: stepper motor, 9: timing belt transmission. (C) Photos of the rotary joint (left) and of the distal end of the fibre-bundle (right), on which the implant and IMU are attached. (D) Configuration of the fibre-bundle active area in front of the image sensor at its optimal reference orientation (OREF) (left), and at any other non-multiple of 90° relative to OREF arbitrary orientation. (right) The green hashed area shows the portion of the fibre bundle array (in blue) that is visible inside the sensor field of view (in red) for the total duration of a sequence of acquisition. With locking in the OREF, this area is larger than with a variable registration orientation, given that the fibre bundle array shape is rectangular.

This mode of operation allows to ensure maximum image stability and to have access to the highest area on the sensor and fibre-bundle elements. It is suitable for acquiring sequences over periods either short enough so that animals do not build significant torsion on the fibre-bundle, or during which the animals are not enticed to turn due to the design of the behavioural task.

2.3. Animals

Experiments were performed on 6 male (behaviour experiments) and 1 female (cortical imaging) 8 to 20 weeks-old C57bl6 mice (Envigo). Protocols were in accordance with the French and European (2010/63/UE) legislations relative to the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. All experimental procedures comply with the ARRIVE guidelines, and were approved by the French Ministry of Education and Research, after consultation with the ethical committee #59 (authorization number: APAFIS#3561-2016010716016314).

Mice were housed in small groups of siblings (4-5 individuals per cage). Housing was enriched with a wheel, a tunnel, nesting material, and toys (Lemessurier et al., 2019) in a normal 12-hour light cycle, with food *ad libitum*.

2.4. Surgical procedure for head implant fixation

Mice were anaesthetised with isoflurane (induction 3–4%, maintenance 1–1.5%). Paw withdrawal, whisker movement and eye-blink reflexes were suppressed. A heating blanket maintained the rectally measured body temperature at 37 °C. The eyes were kept moist with Ocry-gel (TVM Lab) and the head was stabilized with a custom-designed nose clamp. Few minutes after subcutaneous injection of lidocaine (4 mg/kg), the skin covering the skull over the dorsal part of the cerebral hemispheres was removed and the skull cleaned.

A removable chamber was then placed over the left hemisphere, filled with warm physiological solution to keep the skull moist and closed with a glass coverslip. Imaging of intrinsic optical signals (Grinvald et al., 1986) evoked by the mechanical stimulation of the right C2 whisker (1 s at 100 Hz) was performed through the intact skull, under 630 nm light, as described in Ferezou et al., 2006). The reflected light was imaged over the left vS1 with a MiCAM Ultima camera coupled to a THT Macroscope, (SciMedia Ltd). An image taken at 470 nm was then used to locate the activated area in respect of the surface blood vessels. After drying the bone, the head implant could then be fixed, centred on the C2 whisker representation of vS1, with cyanoacrylate glue and dental cement. Mice received a subcutaneous injection of Meloxicam, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, at 0.2 mg/ml before anaesthesia withdrawal.

2.5. Behavioural protocols

Open field exploration

Mice had unrestricted access to food and water prior to experiments. At the start of each session, they were first attached to the fibre-bundle by their implant and then placed inside an empty 30 cm diameter circular open-

field surrounded by 30 cm tall walls, placed in complete darkness, under infrared lightning (**Fig.2A**).

All 6 mice first underwent one session with the optical interface following mice orientation. The next day, the same 6 mice underwent a second session with the optical interface remaining static, regardless of their orientation. At the beginning of the session, care was taken to position the fibre-bundle in the least-torsion orientation, before releasing each mouse in the behavioural arena.

The behaviour of the animals over the course of the whole session was filmed from the top at 500 Hz with a near infrared camera (BAUMER HXC20) and a high-speed acquisition system (R&D Vision).

Whisker-guided locomotion task in a hemi-circular track

Mice were water-restricted (800 µl per day), and their body weight was monitored daily to ensure a weight loss < 20% of their weight before water deprivation (Guo et al., 2014).

The apparatus is adapted from (Kerekes et al., 2017) for mice, and consists of a hemi-circular path surrounded by walls, and a straight lane with a length of 28.5 cm and a width of 7.5 cm, along which an "obstacle" is placed randomly either on the right or on the left side (**Fig.2B**). The entire arena is devoid of any visible light, but equipped with infrared illumination. Mice can only travel in one direction due to doors automatically closing after their passage. Each time mice complete the full path, they receive a reward (one 8 µl drop of water). This motivates mice to run continuously during the session.

The same 6 mice that previously accomplished the open field exploration first performed 14 training sessions without the fibre-bundle (1 session per working day, ending either after 20 minutes or 100 reward deliveries), during which they were able to familiarize themselves with the apparatus and its functioning. They next underwent two sessions, during two consecutive days, where the fibre-bundle was attached to their head and the optical rotary interface was active and following their rotation. The next two days, they all underwent two more experiments with the fibre-bundle attached again but the optical interface staying static throughout the whole session regardless of their orientation. Care was taken at the beginning of the sessions to orient the fibre in the least torsion orientation as described for open-field experiments. We recorded the behaviour of the animals in the exact same manner as for open-field experiments.

2.6. Opto-mechanical characterization experiments

Image sequences for optical characterization

To characterize the mechanical accuracy and the resulting optical reproducibility that our system yields in different conditions as well as background noise, we acquired three types of images sequences. The first type comprises images captured at OREF with no movement of the rotary interface in between each image. It is referred as the "no moving" sequence (NM, **Fig.3A Top**). The second type was acquired by implementing the HR mode of operation as described in

paragraph 2.2. Each image was acquired at OREF, but the rotary interface made series of displacement from 9 to 345° in between each image. It is referred to as the HR sequence. (Fig.3A Middle). The last type of image sequences consisted in acquiring consecutive images with the rotary interface positioned at different locations ranging from 9 to 345° relative to the OREF. Each image was saved along with its corresponding motor orientation, allowing for offline software registration with OREF (as described in paragraph 2.8). Hence, those are referred as software registration (SR) sequences (Fig.3A Bottom).

2.7. VSD imaging in freely moving mice

Surgical procedure and dye staining

After being trained in the whisker-guided locomotion task without and then with the fibre-bundle attached to their head implant, mice were anaesthetised with isoflurane (induction 3–4%, maintenance 1–1.5%). After verification of reflex suppression, craniotomy and a durectomy were then performed inside their head-fixation implant, as described in (Ferezou et al., 2006). The implant features openings on the sides to ease the access of surgical tools to the skull and dura mater. To minimise the time spent under anaesthesia and ensure a fast recovery, this intervention was performed as quickly as possible. Overall, the anaesthesia duration ranged from 40 to 90 min. Just before withdrawal of anaesthesia, mice received a subcutaneous injection of Meloxicam 0.2 mg/ml, and we added a custom designed chamber inside the implant to hermetically contain a volume of about 200 µl of the VSD RH1691 (1 mg/ml, Optical Imaging Ltd.) on top of the exposed cortex. Animals were then allowed to recover from anaesthesia during the 1-2 hr staining of the cortex with the dye. As soon as they showed an active behaviour indicative of a good recovery from anaesthesia, we head-fixed the mice by their implant to carefully open the chamber and wash out the dye over the cortex. Finally, the fibre-bundle was carefully brought down and rigidly fixed to the implant, being in direct contact with the stained cortex. The mice were then placed in the semi-circular track, and ready to start the behavioural session.

VSD imaging during the whisker-guided locomotion task

As soon as a mouse crossed an infrared beam located before the beginning of the straight lane, it triggered the rotary interface to reach OREF, as described in §2.2. Once OREF was reached, the illumination of the cortex through the fibre-bundle started. The 630 nm excitation light from a 100 W halogen lamp was reflected using a 650 nm dichroic mirror within the THT Macroscope and focused onto the proximal fibre end. A second infrared beam located at the beginning of the straight lane next triggered the acquisition of a sequence of 512 images at 2 ms sampling interval and 2 ms exposure time by the Micam Ultima camera. If the illumination stayed active for more than 1 second without the mouse crossing the acquisition trigger beam, or at the end of the acquisition sequence, the illumination stopped, and the optical interface started following mouse orientation again. This allowed to avoid bleaching the dye while no acquisition

was ongoing. The pre-acquisition illumination period helped to avoid acquiring signal in the steeper phase of the VSD fluorescence bleaching effect.

High speed behavioural videos

Synchronously to the acquisition of cortical fluorescent signals, behavioural activity was filmed with an infrared camera (BAUMER HXC20), at the same 2 ms sample interval for the same duration of 512 frames (R&D Vision). High contrast images were obtained by placing an infrared backlight under the transparent floor of the straight lane (850 nm, custom designed).

Anatomo-functional mapping of vS1

At the end of the behavioural training session, without detaching the fibre-bundle distal end, we fixed animals by their head implant, anesthetized them with Isoflurane (induction 3–4%, maintenance 1–1.5%), and checked for reflex suppression. We then imaged fluorescent signals evoked by the deflexion of 2 to 5 different whiskers stimulated individually to map their cortical representation within vS1, as described in (Hubatz et al., 2020b). After this process, mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (140mg/kg) and perfused intracardially with saline followed by paraformaldehyde (4% in 0.1 M phosphate buffer). After an overnight post-fixation in paraformaldehyde, the brains were cut in 100 µm-thick tangential sections and stained for cytochrome oxidase. As described in Perronnet et al. (2016), the layer 4 barrel map was then reconstructed from the stained histological slices, and aligned to the previously acquired functional VSD images using the superficial blood vessels as anatomical landmarks.

2.8. Data Analyses

Animal mobility quantification

The animals' position on the behavioural videos was tracked frame by frame by means of the DeepLabCut toolbox (Mathis et al., 2018). The feature detector deep learning algorithm was trained to identify two markers placed on the animals' head implant, their nose tip, and the base of their tail. Epochs where the nose tip or one of the two markers were not extracted with confidence by the DeepLabCut toolbox were removed from the analysis.

To follow the rotation of animals, we used the yaw component of the output of the orientation filter algorithm of the IMU that was saved during experiments.

Estimation of spatial transformation between images

The measure of the displacement between two images, we used a scale invariant feature transform algorithm (SIFT, Lowe, 2004), which identifies the best features to track in both images and match them. Matched features were then filtered with the RANdom SAMple Consensus (RANSAC, Fischler and Bolles, 1981) method to find the best affine transformation that explained the uniform image rotation and translation.

Software image registration (SR)

The algorithm implemented to register images via software was developed to be compatible with real time

imaging and to be independent on the content of the image, using as a single entry for each frame, the rotation of the motor driving the rotary joint.

Mechanical inaccuracies in the positioning of the fibre-bundle proximal end inside the rotating shaft can cause the centre of the image to describe a circle, instead of a point, during the rotation of the interface in front of the image sensor. To correct for these reproducible inaccuracies, we simply used a calibrated look up table (LUT) of translation and rotation offsets. We built this table by first capturing a frame at the OREF, and then capturing images after positioning the motor at given intervals relative to the OREF. Transformations between images were then computed using the SIFT-RANSAC method described in the paragraph above, and these rotation and translation offsets were used as the LUT entries for each motor orientation.

In the end, the software registered images were obtained by feeding the motor orientation into the software. The LUT resulting from the calibration procedure was then used to compute discrete subpixel values of the rotated frame with a cubic interpolation performed in one step to minimize image blurring with multiple consecutive interpolations.

Processing of Voltage sensitive dye images

Variations of fluorescence over time were computed pixel by pixel as $\Delta F/F_0$, F_0 being computed as the mean of three frames around a chosen reference frame (specified below, in the results section).

To correct for bleaching related artefact, for each image sequence, a 2.5 Hz lowpass Butterworth filter was applied to the profile of fluorescence computed over a large region of interest. The 2nd degree polynomial fit of this filtered trace was subsequently subtracted from the original image sequence. A 2D gaussian filter (5 x 5 pixels) was used to reduce spatial noise on the images.

An inverted fast Fourier transform was used to correct for a visible patterned noise, most likely due a moiré effect linked to the visible spatial structure of our fibre-bundle and its relative orientation in front of the sensor.

3. Results

With the aim of enlarging the spectrum of behavioural tasks compatible with fibroscopic optical methods for reading and controlling neuronal activity in mice, we have developed a motorized rotating optical interface. In its principle, this active optical commutator is adaptable to any type of fibroscopic approach, but here we have implemented and validated it for VSD imaging of a large field (2.5 x 2.5 mm) of the cortical surface through a 90 cm long flexible fibre optic bundle.

3.1. Mobility measured with two different behavioural tests.

To evaluate the benefit that the active optical joint represents in terms of behaviour, we quantified mice displacements when the rotation of the proximal part of the fibre-bundle was fixed, compared to when it actively rotated to follow their orientation. We performed this comparison in the context of an open field test (**Fig.2A**),

but also while mice were performing a whisker-guided locomotion task (**Fig.2B**). In this operant conditioning task, water-deprived animals receive a water-reward each time they complete a full path in a hemi-circular arena (see §2.5).

To assess to what extent the optical joint could restore the ability of mice to rotate during these free exploration and goal directed behaviour contexts, we first computed the distribution of the time spent at each rotation level, expressed in cumulated full revolutions relative to the orientation at the start of the session, where the torsion was minimal (**Fig.2C-D**, left panels). Having the rotary joint active allowed mice to make significantly more consecutive turns in the same direction compared to the inactive joint condition, in both experimental conditions ($P < 0.001$, Wilcoxon signed-rank test). Overall, in the open field test, mice spend 90% of their time below 2.7 full revolutions from their initial position when the joint was inactive, but up 10.2 revolutions while it was active. During the locomotion task, they spent 90% of their time below 3.8 revolutions with the inactive joint but up to 43.6 revolutions when the joint was active. The benefit from the rotary joint was indeed accentuated in the locomotion task where animals, rewarded at each lap of the hemi-circular track, were strongly enticed to cumulate rotations. Nonetheless, while the joint was inactive, the range in which they would spend 90% of their time was similar for both tasks. This suggests that the approximate maximum torsion they could overcome given their strength and the flexibility of our image bundle fell between 3 and 4 turns.

To overcome this limitation of their motion while the joint was inactive, mice could have used a strategy consisting of revolving around themselves to lower the torsion of the image guide when it became too high, and then continue moving in the initially intended direction. This strategy could represent an advantage specifically in the context of the goal-directed locomotion task where animals were motivated to turn repeatedly in the same direction. To assess this possibility, we measured the mean angular velocity for each experimental condition (**Fig.2C-D**, right panels). We observed that in contradiction with this hypothesis, the angular velocity was lower for the locomotion task than in the exploratory open field condition. These results further show that the angular velocity significantly increased with the activation of the joint in both contexts ($P=0.031$ and $P=0.008$, for the open field and locomotion task conditions, respectively, Wilcoxon signed-rank test). Note that this increase was much steeper in the context of the locomotion task (258% vs 50% for the open field condition).

With the aim of evaluating how the rotary joint, by limiting the torsion of the image guide, could impact the overall displacement of the animals, we next analysed the trajectories of the mice during all behavioural sessions.

Left panels in **Fig 2E-F** illustrate the trajectories of the same representative animal along two sessions with, or without the joint active, for the open field test (**Fig2.E**), and for the locomotion task (**Fig2.F**). In both contexts, this particular mouse showed a tendency, after a few

minutes, to remain almost static for prolonged periods of time when the joint was inactive.

When the joint was active however the animal travelled across a much greater area and in a more uniform manner. One can note that in the locomotion task, when the joint was inactive, the location at which this mouse restricted its displacements for prolonged periods of time was at the vicinity of the reward area.

The overall effect of the rotary joint on animals' trajectories was quantified by computing the mean displacement distance during each session for all mice (Fig.2E-F, right panels). We observed that the activation of the joint significantly increased the mean animals'

displacement distances in both contexts ($P=0.031$ and $P=0.002$ for the open field and locomotion task conditions, respectively, Wilcoxon signed-rank test). Once again, while the effect is significant in the open field context, it is much larger in the rewarded task (399% increase vs 78% for the open field task).

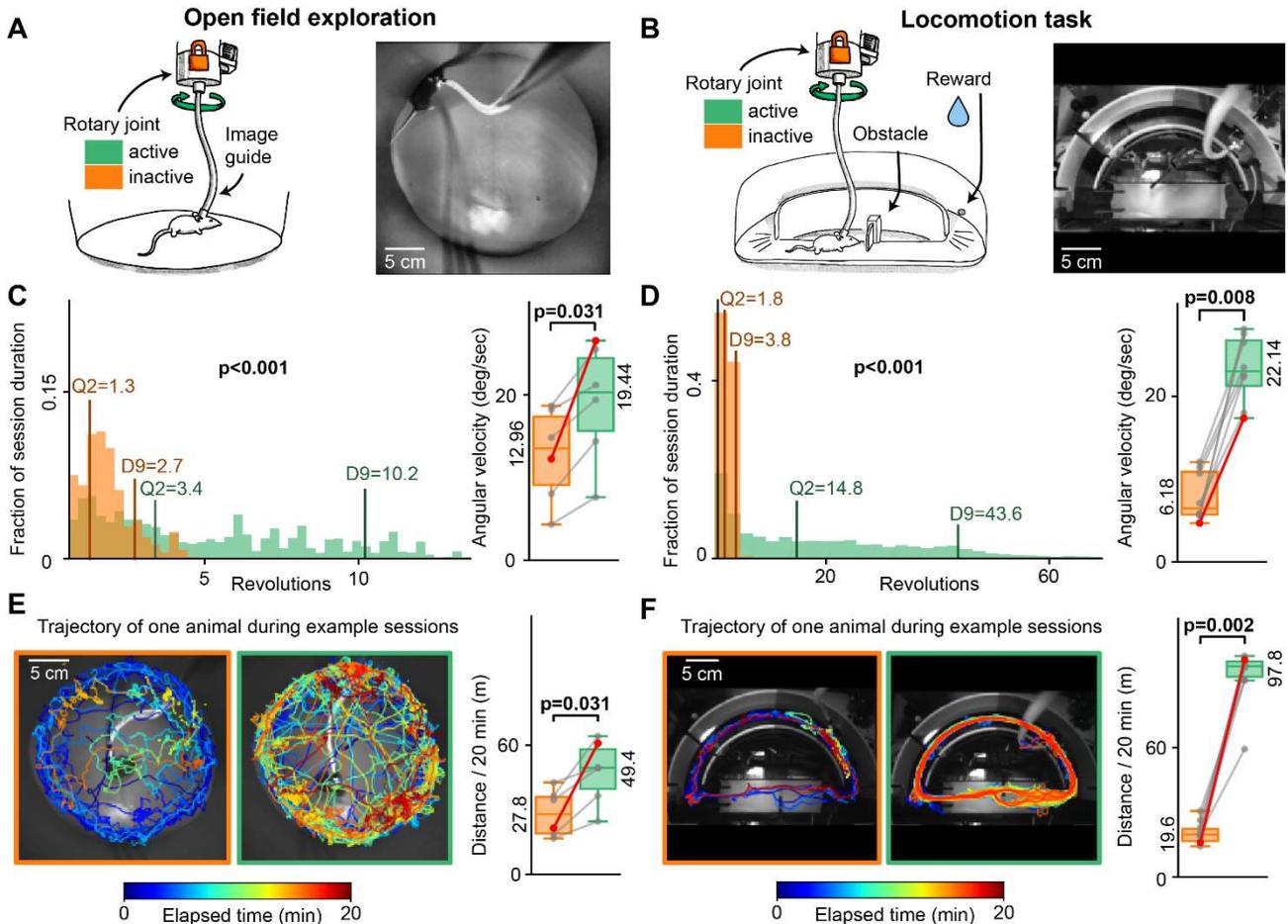


Fig.2: Improvement of the animals' mobility by the active rotary interface.

(A) Sketch (left) and snapshot from the infrared video (right) of the open field arena, showing a mouse with a flexible image guide fixed on its head. (B) Identical to A, for the locomotion task. All experiments were performed in the dark.

For the rest of this figure, the left column panels represent results of open field experiments, and the right relative of the rewarded task. Orange colour indicates results from sessions where the optical rotary interface was permanently inactive and green colour, sessions where the optical rotary interface was following the rotation of the animals.

(C, D) Left: Distribution (in fraction of the total session time [20 min]) of time spent at different levels of rotation, expressed in number of cumulated revolutions (complete 360° turns relative to the starting position, median results for all mice). Vertical lines labelled D9 display the number of revolutions under which falls 90% of the time spent for all sessions, and Q2 display the value under which falls 50% of the time spent for all sessions (median). Right: Boxplots showing the mean angular velocity of head rotations over the whole session for each mouse. Grey lines link values computed from the same animal in active vs inactive joint conditions. The red lines link values from the session pairs exemplified in E and F (left panels).

(E, F) Left: Snapshots from the infrared video taken during behavioural tests, superimposed to mice trajectories, for two 20 min sessions of the same animal. The colour code indicates the time elapsed since the start of the session. Right: Boxplots showing the median displacement distance of all mice. Grey lines link values computed from the same animal in active and inactive joint conditions. The red lines link values extracted from the session pairs illustrated on the left panels.

These results indicate that in a classical fibroscopic configuration, the torsion of the fibre-bundle induces fatigue and/or pain that reduce not only the rotational movements but also the overall displacements of the animals. The motorized rotary joint indeed significantly improves animal mobility, even during a simple exploratory behaviour in an open field arena.

This improvement in mobility, together with the ability to follow continuous rotations, offered by the active rotary joint undoubtedly broadens the spectrum of freely moving behaviours compatible with fibroscopic methods.

3.2. Accuracy of the rotary interface in different operating modes.

In order to acquire registered sequences of images with fibroscopic imaging, here we used a mode of operation where we can briefly lock the rotation of the proximal end of the fibre-bundle in front of the sensor in an optimal reference orientation (OREF) during short sequences of image acquisition, as described in §2.2 (**Fig. 1D**). This mode, named here Hardware Registration (HR), is particularly well suited for high-speed optical methods such as VSD imaging, for which it is not desirable to make continuous recordings (to prevent photo-damage of the tissue). With this strategy, the image stability inside a sequence is very high. However, the accuracy of the repositioning of the rotary joint in front of the sensor before each sequence is an important requirement to allow analysis of the signal originating from defined spatially located areas of the tissue across several sequences or trials.

Another possible mode of operation of the optical joint, which would be particularly well suited for long continuous recordings at lower sampling frequency (as for imaging with calcium indicators), could be to let the motor follow the animal's orientation in between each single frame acquisition, and lock it briefly only during each frame exposure time. The motor position corresponding to each acquired frame is saved synchronously with the image. In this mode of operation, named here Software Registration (SR), registration of the images is computed by leveraging the saved motor orientation and not from an estimation of image rotation based on spatial features in the signal (as described in §2.8).

We evaluated the accuracy of image registration achieved with HR and SR modes of operation of the optical joint, and compared them to a control situation where no movement occurs between two acquired images (NM), as an ideal registration situation (**Fig. 3A**).

Translation error after HR proved to be very reliable, with a median value of 0.38 μm . (**Fig. 3B**). Surprisingly, the SR registration method yielded quite similar results, with median translation error of 1.02 μm . Both were significantly different from the control ideal registration case (NM), with which the median translation error was 0.14 μm . Here this value is assumed to result mostly from the imprecision of the optical measure of

translation error, different from 0 due to the slight background noise in the optical signal.

The translation error of the HR method overall remains below 1 μm . For reference, one pixel of our sensor corresponds to a sampled square of 25 μm side. Thus, a translation error of only 1 μm implies that depending on the direction of that translation, from 4% and up to 5.6% of the sampled area would be biased by light rays that would otherwise have been received by neighbours' pixels in the reference frame.

For rotation error, results were even better for the HR method, which did not differ from the control NM condition (**Fig. 3C**). The SR method however suffered from a greater variability in registration, although it remained very precise with a median below 2 arcmin of error (NM: 0.32, HR: 0.26, SR: 1.59 arcmin).

This spread in the efficacy of registration was probably not due to motor or mechanic imprecision, as hardware registration at OREF is very precise, but rather to an imperfectly calibrated offset rotation look up table (described in paragraph 2.8 and discussed in paragraph 4.2), that changes at the different orientations of the motor.

We then quantified how such spatial imprecisions in the registration erroneously impacted pixels' intensity values relative to the reference image. Examples of raw and relative variations of pixel intensity values with the two registration methods and the control condition show at first sight that SR registration suffers from higher errors (**Fig. 3D**). This may be caused by the nature of the software registration technique, which interpolates sub-pixel values with bi-cubic fitting. This inherently results in errors compared to the local distributions of real pixel values, rather than due to a higher degree of rotation and translation imprecision. Probability density functions describing the distribution of the error in pixel intensity values for the two registration methods and the control condition are shown in **Fig. 3E**. These results demonstrate that the probability for a pixel to have 0.25% (of the full pixel values range) or less variation compared to its identically located pixel in the reference image is 63% for NM, 43% for HR and 22% for SR.

Overall, while both registration methods are significantly different from control, the hardware and software registration methods show levels of spatial precision as well as intensity value changes that are compatible with one photon imaging techniques.

3.3. An example of application: linking VSD imaging of cortical dynamics to behaviour at 500 Hz during a whisker-guided locomotion task.

Initially, we developed this active rotary interface for the visualization of the mesoscopic scale dynamics over the whiskers' representation in the primary somatosensory cortex (vS1) of mice engaged in a whisker-guided locomotion task. With this purpose, we used VSD imaging which correlates with changes in membrane potential of layer 2/3 neurons at the millisecond timescale (Ferezou et al., 2006).

In our experiments carried out under infrared light, the behaviour of the mice was recorded synchronously with the cortical activity, at 500 Hz, while mice ran in the straight lane of the previously described hemi-circular track. An obstacle was positioned randomly on the right or the left side of this straight lane, so the mice had to actively probe their environment with their whiskers to avoid collisions. **Fig.4** illustrates an example experiment. One can note that the image of the resting VSD fluorescence taken at OREF (**Fig4.A**) reveals the pattern of multiple 6x6 multifibre elements of our image guide (§2.1, Ferezou et al., 2006). The whiskers' representation within the primary somatosensory cortex (vS1) is characterized by the presence, at the level of the layer 4, of cellular aggregates, named barrels, which are topologically organized as the whiskers on the animal's snout. This barrel map could be reconstructed post hoc from tangential brain slices stained for cytochrome oxidase, and realigned with the functional images (**Fig4.A**, see details in §2.7 and Perronnet et al., 2016).

During this session, the gain of mobility provided by the active rotary interface allowed us to image cortical activity during up to 39 minutes, and 236 rewarded trials (and equal number of full turns) with stable signal over time. Most trials exhibited large wave-like activities recorded consistently from the beginning to the end of the session (**Fig.4B**). Indeed, large static or traveling depolarisations occurred in a high proportion of the trials. These events frequently occurred 300 to 600 ms following the onset of the acquisition, while the mouse was in the vicinity of the obstacle, in the central portion of the straight lane. Although the detailed description of these events and their relation to the animal behaviour is out of the scope of this study, it can be noted here that they appeared to have variable spatial origins, and direction of propagation, as exemplified for 3 selected trials (**Fig. 4C, D**). Few trials showed activity emerging in the barrel cortex, as for trial #87. Other events seemed to emerge simultaneously in multiple areas, inside or outside the whiskers' representation field, as in trials #33 and #177.

Overall, we demonstrated that the motorized optical rotary joint allows to make repeated acquisitions of cortical activity on freely moving animals over long periods of time, with good signal levels, similar to those shown in a previous study carried on a similar setup without optical joint (Ferezou et al., 2006). However, the strong improvement of the animal's mobility and ability to turn provided by the joint gives the opportunity to couple such recordings with a much broader range of behaviours.

4. Discussion

To allow the combination of fibroscopic approaches for the imaging or manipulation of neuronal activity in free-moving mice with a broad spectrum of behavioural protocols, we have designed and implemented an active optical rotary joint, which can follow the rotation of the animal by means of an embedded inertial measurement unit.

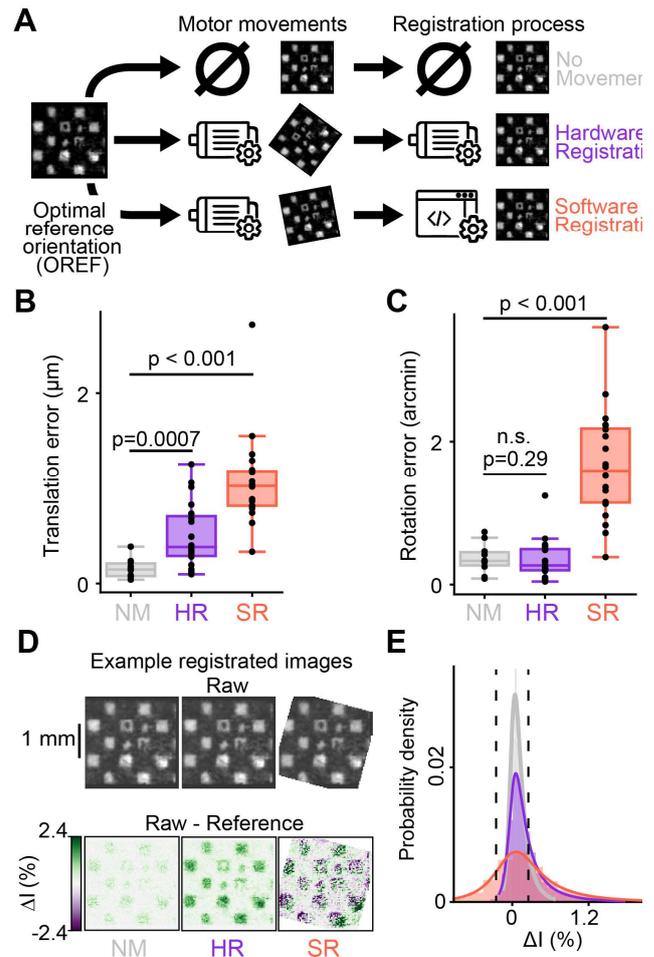


Fig.3: Locking the interface at a reference orientation in front of sensor produces best optical performances.

(A) Illustration of the different steps carried out to evaluate the accuracy of the hardware (HR) and software (SR) registration methods. A reference image was first acquired at OREF. A series of 25 images was then captured without moving the interface in-between (no movement [NM] condition). A second set of 25 images (HR) was taken with the interface in the reference position, but with the rotating interface being moved to an arbitrary orientation (between 9 and 345 deg) between each image acquisition. A third set of images (SR) was captured at orientations between 9 and 345 deg and registered offline to the initial reference image, based on the known motor position (see methods).

(B) Translation error and (C) rotation error from frames of NM, HR and SR sequences compared to the reference image. These are the results of an affine transformation estimation based on pairs of tracked points on reference and test images (see methods).

(D) Example raw images registered with different methods (top) and their difference with reference image (variation of pixel intensity (ΔI) expressed in percentage of full pixel intensity range, bottom).

(E) Probability density graph of the variation of intensity between each pixel of the registered image, and its equally located counterpart on the reference image, for the two methods of registration and the control condition ($n = 25$ for each group). Faded histograms represent data distributions, curves represent normal inverse gaussian fits of the data distributions. Black dashed-lines indicates $\pm 0.25\%$ intensity variation compared to the reference image.

We have established that its use strongly enhances the animal mobility in different behavioural contexts, and advantageously opens the possibility of using fibroscopy during a task which requires the animal to rotate continuously in the same direction. We indeed demonstrated its effectiveness for VSD imaging of cortical activity in vS1 of mice engaged in a whisker guided locomotion task on a hemi-circular track. Moreover, the different possible modes of operation of the rotary joint make it adaptable to the needs of various optical methods and behavioural tasks.

4.1. Possible modes of operation of the rotary interface

The hardware registration mode that we first implemented is well suited for short sequences of imaging/photo-stimulation at high sampling rates, alternating with periods of free behaviour, exempt of optical acquisition/stimulation. By blocking the fibre-bundle proximal end at OREF during entire series of acquisitions/stimulations, this sequential mode of operation optimizes the spatio-temporal resolution and quality of optical signals.

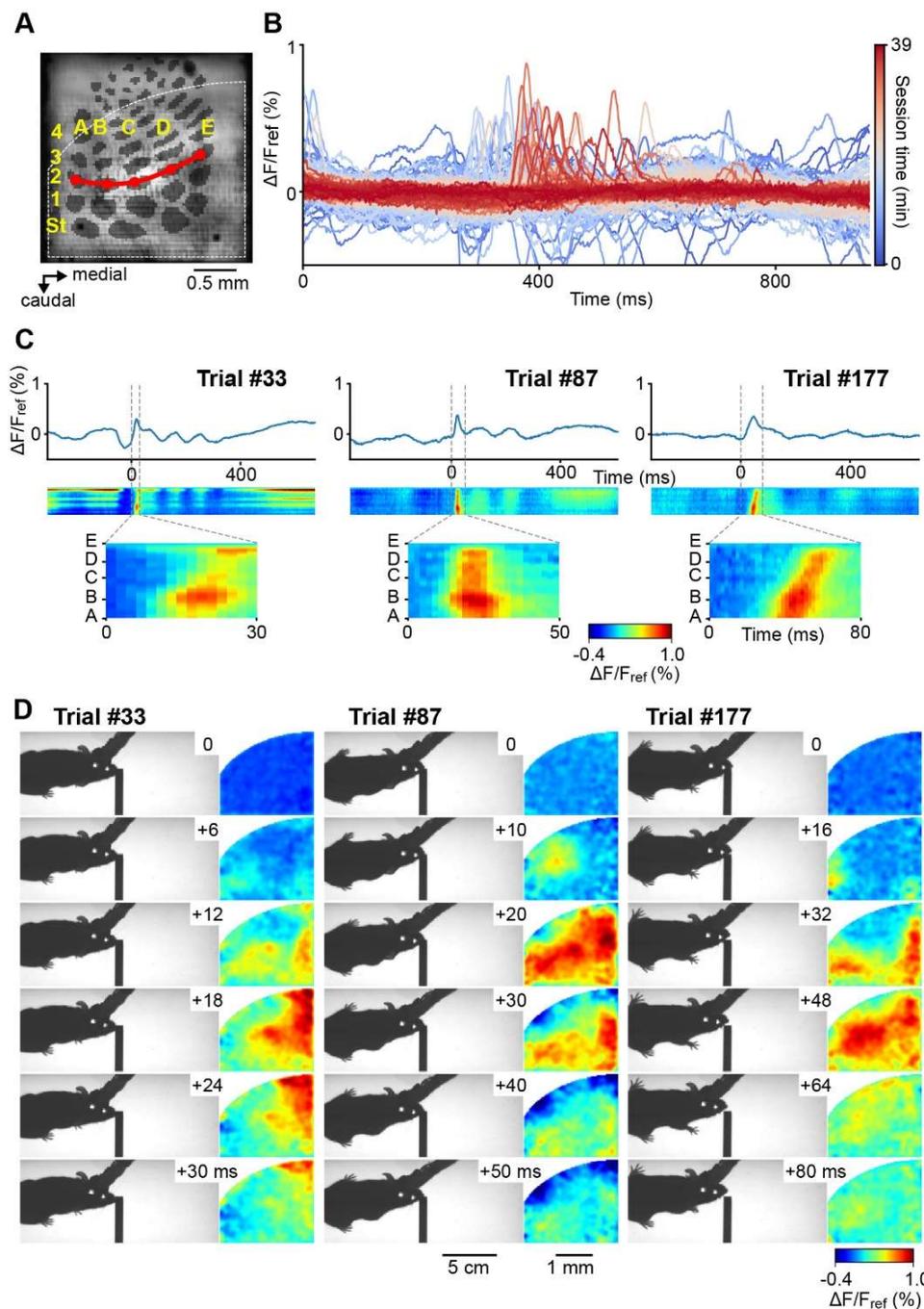
Fig.4: Linking VSD imaging of cortical dynamics to behaviour at 500 Hz during a locomotion task.

(A) Resting VSD fluorescence imaged through the fibre-bundle at OREF. The layer 4 barrel map of vS1 reconstructed from a post hoc cytochrome oxidase staining is overlaid on the image (darker gray). Rows are named with letters and arcs with numbers, except the more caudal arc that corresponds to the four straddlers (St). Part of the field of view used for subsequent fluorescence quantification is shown as dashed white outline. The red line through arc 2 was used to compute the linescan plots shown in panel C. The two dark spots, visible at the bottom-left of the field of view and inside alpha barrel, are broken fibres sub-assemblies (6x6 8µm fibres)

(B) Variation of VSD fluorescence quantified from a large region of interest (dashed white outline in A) for all the trials of this session (from the first trial in dark blue, to the last trial in dark red). A large proportion of trials exhibit large cortical depolarisation at around 300 to 600 ms from trial onset.

(C) Fluorescence profiles of three example trials from the same session (top) and corresponding linescan plots (middle, time on x axis and space on y axis) computed from a line spanning the second arc of the barrel map (red line in A). Reference time 0 corresponds to the onset of a large cortical depolarisation displayed with expanded scale just below (bottom).

(D) For each trial, on the right are shown 6 snapshots showing relative variations of fluorescence ($\Delta F/F_{ref}$, F_{ref} being an average of 3 frames centered at time 0). On the left are the corresponding snapshots of the infrared behaviour video, captured synchronously with the VSD images, in the straight lane of the track.



In the second operating mode of the rotary interface, the motor is never locked at OREF, but follows the animal's orientation in a semi-continuous manner. It is indeed locked briefly at arbitrary rotation angles only during each frame exposure time to prevent motion blur, and is free to follow the animal's orientation in between each frame. This mode of operation implies that photon collection has to be spaced by at least the amount of time necessary for the motor to move the average angle animals can rotate in the interval between two frames. It is therefore suitable for imaging at lower sampling rates, as for calcium imaging. Images are then registered via software means, based on the motor position saved at the time they were captured. This approach thus has the advantage of allowing for very long acquisitions, but does so at the expense of spatio-temporal resolution. In addition, it should be noted that in this mode, the illumination homogeneity will matter more than for the sequential mode. Indeed, as here the illumination system remains static, while the orientation of the fibre bundle proximal end is not, inhomogeneous light source could induce variations of excitation light likely to impact emitted fluorescence signals.

Finally, the rotary interface could also be used in a third, hybrid mode, for which the fibre bundle proximal end would be locked at OREF and the mouse orientation constantly monitored by means of the inertial measurement unit, like for the first sequential mode. As soon as the offset between OREF and the animal's orientation exceeds 360 degrees, fast movement of the motor could be triggered to compensate the torsion of the image guide. The motor would then quickly lock its proximal end back at OREF. This cycle could continue indefinitely, resulting in a pseudo-continuous acquisition. In term of optical properties, the functioning of this mode of operation is similar to the first sequential mode of operation and should give exactly identical results, optimizing optical quality of the signal, but would result in short interruptions occurring at unpredictable times (depending on the behavioural task design).

4.2. Mechanical factors that may impact the registration accuracy

Both the hardware and software registration methods implemented with the motorized rotating optical interface could be impacted by a mechanical backlash phenomenon. Backlash is here defined as a loss of motion occurring because the change in direction of the motor is not applied instantaneously to the mechanically coupled part, due to coupling tolerances or material elasticity. It can be minimized but not removed entirely, unless using specific, expensive so-called "zero-backlash" mechanical systems. If not taken into consideration, locking to OREF could result in slightly different orientations of the proximal end of the fibre bundle, depending on the direction of motor's rotation prior to locking. A simple but sub-optimal solution to this concern can be to systematically move back and forth the motor in the same direction prior to each lock at OREF, for a radial distance greater than the observed backlash. Electro-mechanical inaccuracies in the positioning of the fibre-bundle due to backlash or fast

movements can also be corrected with a closed loop control system, comprising a rotary encoder fixed at the fibre-axis preferably to the motor axis.

Another important mechanical aspect, especially for working in a continuous acquisition mode, is the axial alignment between the centre of the sensor and the central axis of the fibre-bundle proximal end. As described in the method section, this can be addressed on a software basis, by calibrating a look up table of rotation and translation offsets based on motor position relative to OREF. It could also be solved by specific mechanical designs ensuring high levels of concentricity such as concentric clamping systems (i.e., collet chucks). However, for our specific use-case, imaging the whole vS1 cortex with sub-columnar resolution (25 μm per pixel), the level of spatial accuracy with hardware registration at OREF was more than sufficient by simply using three screws axially placed 120° apart to adjust the concentricity of the rotary joint.

4.3. Remarks for inertial measurements-based orientation estimation

The IMU used on the animals' head is a handy alternative to torque sensors often used for assisted rotary joints. It can allow the acquisition of a direct measure of the fibre-bundle orientation, regardless of its flexibility properties. Torque sensors measure depends on these properties, thus requiring sensitivity adjustments to work well on different animals with different fibre-bundle types. This sensitivity issue simply doesn't exist with the use of an on-board IMU, with the very small constraint of having 4 additional thin wires following the image guide.

On the other hand, the absolute position calculation heavily relies on magnetometer measurements. It's the only component of the 3 integrated devices (accelerometer, gyroscope, magnetometer) that does not measure intrinsic motion but an extrinsic reference, and as such, that does not suffer from error accumulation. This component is sensitive to magnetic distortions and requires calibration. If imperfectly done, it results in loss of accuracy of the orientation calculation.

Multiple algorithmic strategies have been recently proposed to better generalize the orientation calculation regardless of environmental perturbations (Yadav and Bleakley, 2014), or calibration specificities, by using deep neural networks instead of more generic algorithms (Weber et al., 2021), which could make this approach easier to setup.

4.4. Comparison with rotating prism optical joints

Some methodologies can register several optical paths or an image on a rotative interface using rotating prisms, among which dove prisms are the most commonly used (Swift, 1972). In general terms, these prisms produce an image rotated by an angle twice the amount of the prism's rotation. A mechanical assembly to link the rotation of the prism to that of the image guide, so that the rotation speed of the prism is always equal to half the rotation speed of the image guide, could then be used to "de-rotate" images.

Indeed, a successful and reliable implementation of such a device would have numerous advantages compared to our device. Principally, an ideal optical registration-based rotary joint would completely remove any need for post-hoc image registration. It would also allow to acquire fully continuous sequences of images without requiring a “gap” between the exposure-time of two frames, as it is the case for the semi-continuous acquisition mode described above.

It is known however that using dove prisms to produce rotated image without inducing rotational or translational shifts requires very precise alignment of the prism “to within a fraction of the wavelength of the light” (Zhou *et al.*, 2016). Furthermore, when a variable continuous rotation is required, it becomes tremendously difficult to keep a stable alignment as mechanical rotation is applied. Finally, dove prism and the turning sample (here the fibre-bundle’s proximal end) rotations must be synchronized, with a $\frac{1}{2}$ ratio angular speed for the prism relative to the sample. As described in the paragraph 4.2, mechanical backlash would cause important issues in term of rotation synchrony and would occur each time rotation direction changes.

Although the imprecisions resulting from all these phenomena could be measured for several orientations of the device, in order to produce a transfer function of translation and rotation offsets in respect to current orientation, this would require post-hoc software image registration and thus would annihilate the benefits of having an analogic optical system to register images in the first place.

Interestingly, some authors proposed non-mechanical image rotation methods using acousto-optic deflectors (Paek *et al.*, 1997) that would have the benefit of being able to apply the aforementioned transfer function to correct irregularities in a real time. However, this technique imposes the use of discrete rotational amounts which, if too large spatially, again causes the need for brief motor stops during frames exposure to avoid motion blur.

Recently a new, yet theoretical, scheme was proposed to allow performing similar non-mechanical rotation of images but in a non-discrete manner (Zhou *et al.*, 2016). This method however is described by the authors as wavelength dependant and thus would not be well suited for fluorescence imaging requiring at least two wavelengths to be transmitted bidirectionally.

Overall, for the specific use of imaging small fluorescence changes with low artefactual perturbations, other optical tools available do not appear to provide viable solutions so far.

4.5. Methodological outlook.

Convinced of the need to combine optical methods for measuring and monitoring neural activity with behaviour in the awake animal, the neuroscientific community has made considerable efforts, either to adapt behavioural task designs to be compatible with animal’s head fixation under the most powerful optical devices, or to adapt optical methods for a use in freely moving animals. Alternative approaches that use a fibre optic

bundle to link a powerful and potentially cumbersome optical system to a free-moving animal have so far been hampered by the fact that the problem of optical cables twisting with animal’s rotations cannot be handled as easily as for electrical cables.

The motorised rotating interface we propose here, solving this limitation due to optical cable torsion in an efficient and relatively easy to set up manner, opens up a new field of possibilities for fibroscopic approaches. It indeed allows combining the use of any optical device for imaging (or multi-site photometry, Kim *et al.*, 2016; Sych *et al.*, 2019), and/or patterned photoactivation, with a large range of freely moving behaviours, including any operant conditioning task requiring the animal to rotate continuously in the same direction. The exploratory behaviour of the animals observed here in the open field condition suggests that the rotary joint represents a considerable asset for studying other spontaneous behaviours such as social interactions. Of course, as soon as one wishes to record several animals simultaneously, problems of cable entanglement would arise, which could be solved only with a completely wireless approach. Although such technologies are emerging for one-photon endoscopy, allowing either onboard data acquisition (Barbera *et al.*, 2019; Shuman *et al.*, 2020) or radiofrequency data transmission (Iii, Perkins and Leman, no date; Liberti *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022), they are relatively cumbersome for mice due to the necessary integrated battery, and their temporal resolution remains limited (below 50Hz).

Overall, fibroscopic approaches combined with an optical rotary joint represent an outstanding tool to link neuronal activity with behaviour in mice, at the millisecond timescale.

References:

- Ayaz, A., Stäuble, A., Hamada, M., Wulf, M.A., Saleem, A.B., and Helmchen, F. (2019). Layer-specific integration of locomotion and sensory information in mouse barrel cortex. *Nature Communications* 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10564-8>.
- Barbera, G., Liang, B., Zhang, L., Li, Y., and Lin, D.T. (2019). A wireless miniScope for deep brain imaging in freely moving mice. *J. Neurosci. Methods* 323, 56–60. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2019.05.008>.
- Cai, D.J., Aharoni, D., Shuman, T., Shobe, J., Biane, J., Song, W., Wei, B., Veshkini, M., La-Vu, M., Lou, J., et al. (2016). A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. *Nature* 534, 115–118. <https://doi.org/10.1038/nature17955>.
- Chemla, S., Muller, L., Reynaud, A., Takerkart, S., Destexhe, A., and Chavane, F. (2017). Improving voltage-sensitive dye imaging: with a little help from computational approaches. *Neurophotonics* 4, 031215. <https://doi.org/10.1117/1.nph.4.3.031215>.
- Deisseroth, K. (2015). Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci* 18, 1213–25. <https://doi.org.insb.bib.cnrs.fr/10.1038/nn.4091>.
- Dombeck, D.A., and Reiser, M.B. (2012). Real neuroscience in virtual worlds. *Current Opinion in Neurobiology* 22, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.10.015>.
- Dombeck, D.A., Harvey, C.D., Tian, L., Looger, L.L., and Tank, D.W. (2010). Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nature Neuroscience* 13, 1433–1440. <https://doi.org/10.1038/nn.2648>.
- Dussaux, C., Szabo, V., Chastagnier, Y., Fodor, J., Léger, J.F., Bourdieu, L., Perroy, J., and Ventalon, C. (2018). Fast confocal fluorescence imaging in freely behaving mice. *Scientific Reports* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34472-x>.
- Emiliani, V., Cohen, A.E., Deisseroth, K., and Häusser, M. (2015). All-optical interrogation of neural circuits. *Journal of Neuroscience* 35, 13917–13926. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2916-15.2015>.
- Ferezou, I., Bolea, S., and Petersen, C.C.H. (2006). Visualizing the Cortical Representation of Whisker Touch: Voltage-Sensitive Dye Imaging in Freely Moving Mice. *Neuron* 50, 617–629. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.043>.
- Fischler, M.A., and Bolles, R.C. (1981). RANSAC: Random Sample Paradigm for Model Consensus: An Applications to Image Fitting with Analysis and Automated Cartography. *Communications of the ACM* 24, 381–395. <https://doi.org/10.1145/358669.358692>.
- Ghosh, K.K., Burns, L.D., Cocker, E.D., Nimmerjahn, A., Ziv, Y., Gamal, A. el, and Schnitzer, M.J. (2011). Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nature Methods* 8, 871–878. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1694>.
- Grinvald, A., and Hildesheim, R. (2004). VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 874–885. <https://doi.org/10.1038/nrn1536>.
- Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R.D., Gilbert, C.D., and Wiesel, T.N. (1986). Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324, 361–364. <https://doi.org/10.1038/324361a0>.
- Guo, Z. V., Hires, S.A., Li, N., O'Connor, D.H., Komiyama, T., Ophir, E., Huber, D., Bonardi, C., Morandell, K., Gutnisky, D., et al. (2014). Procedures for behavioral experiments in head-fixed mice. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088678>.
- Hölscher, C., Schnee, A., Dahmen, H., Setia, L., and Mallot, H.A. (2005). Rats are able to navigate in virtual environments. *Journal of Experimental Biology* 208, 561–569. <https://doi.org/10.1242/jeb.01371>.
- Hoy, J.L., Yavorska, I., Wehr, M., and Niell, C.M. (2016). Vision Drives Accurate Approach Behavior during Prey Capture in Laboratory Mice. *Current Biology* 26, 3046–3052. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.009>.
- Hubatz, S., Hucher, G., Shulz, D.E., and Férézou, I. (2020). Spatiotemporal properties of whisker-evoked tactile responses in the mouse secondary somatosensory cortex. *Sci. Rep.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57684-6>.
- Inoue, M. (2021). Genetically encoded calcium indicators to probe complex brain circuit dynamics in vivo. *Neuroscience Research* 169, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.05.013>.
- Kerekes, P., Daret, A., Shulz, D.E., and Ego-Stengel, V. (2017). Bilateral Discrimination of Tactile Patterns without Whisking in Freely Running Rats. *The Journal of Neuroscience* 37, 7567–7579. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0528-17.2017>.
- Kim, T.H., and Schnitzer, M.J. (2022). Fluorescence imaging of large-scale neural ensemble dynamics. *Cell* 185, 9–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.007>.
- Kim, C.K., Yang, S.J., Pichamoorthy, N., Young, N.P., Kauvar, I., Jennings, J.H., Lerner, T.N., Berndt, A., Lee, S.Y., Ramakrishnan, C., et al. (2016). Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nature Methods* 13, 325–328. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3770>.
- Kislin, M., Mugantseva, E., Molotkov, D., Kuleskaya, N., Khirug, S., Kirilkin, I., Pryazhnikov, E., Kolikova, J., Toptunov, D., Yuryev, M., et al. (2014). Flat-floored air-

- lifted platform: A new method for combining behavior with microscopy or electrophysiology on awake freely moving rodents. *Journal of Visualized Experiments* 88, e51869. <https://doi.org/10.3791/51869>.
- Klioutchnikov, A., Wallace, D.J., Sawinski, J., Voit, K.-M., Groemping, Y., Kerr, J.N.D., and Kerr, J. (2022) A three-photon head-mounted microscope for imaging all layers of visual cortex in freely moving mice. *BiorXiv Preprint*. <https://doi.org/10.1101/2022.04.21.489051>.
- Knöpfel, T., Song C. (2019). Optical voltage imaging in neurons: moving from technology development to practical tool. *Nature Reviews Neuroscience* 20, 719–727. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0231-4>.
- Knöpfel, T., Lin, M.Z., Levskaya, A., Tian, L., Lin, J.Y., and Boyden, E.S. (2010). Toward the second generation of optogenetic tools. *The Journal of Neuroscience* 30, 14998–15004. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4190-10.2010>.
- Lemessurier, A.M., Laboy-Juiárez, K.J., McCiain, K., Chen, S., Nguyen, T., and Feldman, D.E. (2019). Enrichment drives emergence of functional columns and improves sensory coding in the whisker map in L2/3 of mouse S1. *Elife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.46321>.
- Liberti WA, Perkins LN, Leman DP, Gardner TJ. (2017). An open source, wireless capable miniature microscope system. *J Neural Eng.* 14, 045001. <https://doi.org/10.1088/1741-2552/aa6806>.
- Liberti, W.A., Schmid, T.A., Forli, A., Snyder, M., and Yartsev, M.M. (2022). A stable hippocampal code in freely flying bats. *Nature* 604, 98–103. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04560-0>.
- Lin, M.Z., and Schnitzer, M.J. (2016). Genetically encoded indicators of neuronal activity. *Nature Neuroscience* 19, 1142–1153. <https://doi.org/10.1038/nn.4359>.
- Lowe, D.G. (2004). Lowe, D.G. Distinctive Image Features from Scale-Invariant Keypoints. *International Journal of Computer Vision* 60, 91–110. <https://doi.org/10.1023/B:VISI.0000029664.99615.94>.
- Madgwick, S.O.H. (2010). An efficient orientation filter for inertial and inertial/magnetic sensor arrays. *Report X-10 and University of Bristol (UK)* 792–799. <https://doi.org/10.1109/ETFA.2018.8502581>.
- Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K.M. et al. (2018). DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat Neurosci* 21, 1281–1289. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0209-y>.
- Ozbay, B.N., Futia, G.L., Ma, M., Bright, V.M., Gopinath, J.T., Hughes, E.G., Restrepo, D., and Gibson, E.A. (2018). Three dimensional two-photon brain imaging in freely moving mice using a miniature fiber coupled microscope with active axial-scanning. *Scientific Reports* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26326-3>.
- Paek, E.G., Choe, J.Y., Oh, T.K., Hong, J.H., and Chang, T.Y. (1997). Nonmechanical image rotation with an acousto-optic dove prism. *Optics Letters* 22, 1195. <https://doi.org/10.1364/OL.22.001195>.
- Perronnet, L., Vilarchao, M.E., Hucher, G., Shulz, D.E., Peyré, G., and Ferezou, I. (2016). An automated workflow for the anatomo-functional mapping of the barrel cortex. *Journal of Neuroscience Methods* 263, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.09.008>.
- Poort, J., Khan, A.G., Pachitariu, M., Keller, G.B., Mrsic-flogel, T.D., Hofer, S.B., Poort, J., Khan, A.G., Pachitariu, M., Nemri, A., et al. (2015). Learning Enhances Sensory and Multiple Non-sensory Representations in Primary Visual Cortex. *Neuron* 86, 1478–1490. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.037>.
- Radvansky, B.A., and Dombeck, D.A. (2018). An olfactory virtual reality system for mice. *Nature Communications* 9, 839. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03262-4>.
- Royer, S., Zemelman, B. v, Losonczy, A., Kim, J., Chance, F., Magee, J.C., and Buzsáki, G. (2012). Control of timing, rate, and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition. *Nature Neuroscience* 15, 769–775. <https://doi.org/10.1038/nn.3077>.
- Rynes, M.L., Surinach, D.A., Linn, S., Laroque, M., Rajendran, V., Dominguez, J., Hadjistamoulou, O., Navabi, Z.S., Ghanbari, L., Johnson, G.W., et al. (2021). Miniaturized head-mounted microscope for whole-cortex mesoscale imaging in freely behaving mice. *Nature Methods* 18, 417–425. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01104-8>.
- Shuman, T., Aharoni, D., Cai, D.J., Lee, C.R., Chavlis, S., Page-Harley, L., Vetere, L.M., Feng, Y., Yang, C.Y., Mollinedo-Gajate, I., et al. (2020). Breakdown of spatial coding and interneuron synchronization in epileptic mice. *Nat. Neurosci.* 23, 229–238. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0559-0>.
- Sofroniew, N.J., Cohen, J.D., Lee, A.K., and Svoboda, K. (2014). Natural Whisker-Guided Behavior by Head-Fixed Mice in Tactile Virtual Reality. *The Journal of Neuroscience*, 34, 9537–9550. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0712-14.2014>.
- Stamatakis, A.M., Schachter, M.J., Gulati, S., Zitelli, K.T., Malanowski, S., Tajik, A., Fritz, C., Trulson, M., and Otte, S.L. (2018). Simultaneous optogenetics and cellular resolution calcium imaging during active behavior using a miniaturized microscope. *Frontiers in Neuroscience* 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00496>.

- Swift, D.W. (1972). Image rotation devices — a comparative survey. *Optics & Laser Technology* 4, 175–188. [https://doi.org/10.1016/0030-3992\(72\)90006-0](https://doi.org/10.1016/0030-3992(72)90006-0).
- Sych, Y., Chernysheva, M., Sumanovski, L.T., and Helmchen, F. (2019). High-density multi-fiber photometry for studying large-scale brain circuit dynamics. *Nature Methods* 16, 553–560. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0400-4>.
- Szabo, V., Ventalon, C., de Sars, V., Bradley, J., and Emiliani, V. (2014). Spatially selective holographic photoactivation and functional fluorescence imaging in freely behaving mice with a fibroscope. *Neuron* 84, 1157–1169. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.005>.
- Wang, Y., Ma, Z., Li, W., Su, F., Wang, C., and Xiong, W. (2022). Title Cable-free brain imaging with miniature wireless microscopes. *BiorXiv Preprint*. <https://doi.org/10.1101/2022.06.20.496795>.
- Weber, D., Gühmann, C., and Seel, T. (2021). RIANN—A Robust Neural Network Outperforms Attitude Estimation Filters. *Ai* 2, 444–463. <https://doi.org/10.3390/ai2030028>.
- Yadav, N., and Bleakley, C. (2014). Accurate orientation estimation using AHRS under conditions of magnetic distortion. *Sensors (Switzerland)* 14, 20008–20024. <https://doi.org/10.3390/s141120008>.
- Yu, H., Senarathna, J., Tyler, B.M., Thakor, N. v., and Pathak, A.P. (2015). Miniaturized optical neuroimaging in unrestrained animals. *Neuroimage* 113, 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.02.070>.
- Zhang, J., Hughes, R.N., Kim, N., Fallon, I.P., Bakhurin, K., Kim, J., Paolo, F., Severino, U., Yin, H.H. (2021). All-optical imaging and patterned stimulation with a one-photon endoscope. *BiorXiv Preprint*. <https://doi.org/10.1101/2021.12.19.473349>.
- Zhou, H., Dong, J., Wang, J., and Zhang, X. (2016). Tunable image rotator of light with optical geometric transformation. *IEEE Photonics Journal* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1109/JPHOT.2016.2604041>.
- Ziv, Y., and Ghosh, K.K. (2015). Miniature microscopes for large-scale imaging of neuronal activity in freely behaving rodents. *Current Opinion in Neurobiology* 32, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.04.001>.
- Ziv, Y., Burns, L.D., Cocker, E.D., Hamel, E.O., Ghosh, K.K., Kitch, L.J., Gamal, A. el, and Schnitzer, M.J. (2013). Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes. *Nature Publishing Group* 16, 264–266. <https://doi.org/10.1038/nn.3329>.
- Zong, W., Obenhaus, H.A., Skytøen, E.R., Eneqvist, H., de Jong, N.L., Vale, R., Jorge, M.R., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2022). Large-scale two-photon calcium imaging in freely moving mice. *Cell* 185, 1240–1256.e30. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.017>.

Procédures chirurgicales

Implantation

L'implantation est réalisée sous anesthésie générale (isoflurane, induction 3% 2 L/min, maintien 1-2% 0.5-1 L/min) et avec application d'un analgésique local (lidocaïne 4 mg/kg) au niveau de la zone d'incision. Le maintien de la tête des animaux est réalisé avec un dispositif de fixation au niveau du nez, auquel est fixé le masque apportant l'isoflurane et aspirant de manière concentrique le gaz en excès. La température corporelle des animaux est suivie au cours de l'opération, et un coussin chauffant thermostaté les maintient à 35-37°C, palliant les effets perturbateurs de l'anesthésie sur la thermorégulation. Les yeux des animaux sont couverts avec du gel oculaire (Ophtalon).

Une fois la peau ouverte (surface ~1cm²), l'os est séché et les membranes à la surface du crâne sont enlevées par grattage à l'aide d'un scalpel orienté orthogonalement à la surface du crâne. Les muscles latéraux du crâne sont délicatement poussés de l'arcade osseuse latérale à l'aide d'un outil dont l'extrémité est arrondie afin de libérer la périphérie de la zone crânienne sans avoir à les couper. Le crâne est ensuite strié avec un scalpel (à l'exception du quart postérieur gauche, se situant au-dessus du cortex somatosensoriel primaire) afin d'augmenter la surface de contact et donc l'adhérence entre la colle appliquée par la suite et le crâne. L'implant est positionné au-dessus du cortex à tonneaux en localisant celui-ci à l'aide de l'activité évoquée mesurée en imagerie intrinsèque (voir paragraphe ci-après). L'implant est ensuite fixé à l'aide de colle cyanoacrylate, réalisant une première couche d'adhésion entre le crâne et l'implant. Les interstices sont ensuite remplis avec du ciment chirurgical, réalisant la seconde couche structurelle de maintien de l'implant. Un anti-inflammatoire (Meloxicam, 8 mg/kg) est ensuite injecté par voie sous-cutanée, 10 min avant le réveil des animaux. Les cages des animaux sont maintenues chauffées par un plateau thermostaté, pour assister la thermorégulation des animaux pendant quelques heures suite à l'opération. Leur poids est suivi après implantation, jusqu'à récupération du poids préopératoire, et ils bénéficient d'une surveillance particulière pendant une semaine.

Imagerie intrinsèque trans-osseuse

La fixation de l'implant sur une zone correspondant au centre du cortex à tonneaux, dont les valeurs théoriques de localisation par rapport au bregma sont +3.3 latéral, -1.5 postérieur, est permise par imagerie trans-osseuse des variations de signaux optiques intrinsèques durant l'implantation. Une chambre en plastique transparent d'environ 1cm de diamètre et 2-3mm de haut, couverte par une lamelle en verre de microscopie et remplie de solution Ringer à ~37°C (135mM NaCl – 5mM KCl – 5mM C₈H₁₈N₂O₄S – 1mM MgCl₂·4H₂O – 1.8 mM CaCl₂·2H₂O) est appliquée autour de ces coordonnées. L'étanchéité entre la chambre et le crâne est réalisée à l'aide d'un élastomère silicone à polymérisation rapide biocompatible (Kwik-Cast), facilement retiré à l'issue de l'imagerie. Cette chambre remplie d'une solution physiologique permet de rendre le crâne translucide durant l'imagerie, ce qui est crucial pour le bon fonctionnement de cette technique qui consiste à mesurer les variations de lumière réfléchie à la surface du cortex ($\lambda = 630$ nm). L'imagerie est réalisée à 20 Hz à l'aide d'un microscope couplé à une caméra. La vibrisse centrale C2 est insérée à l'aide d'une loupe binoculaire par l'opérateur dans un tube accroché à un stimulateur piézo-électrique. Au cours de 30 à 60 séquences d'images de 12 secondes, le contrôleur délivre, après 2 secondes, des stimulations vibrissales antéropostérieures de la vibrisse C2 à 100 Hz pendant 1 s. Le moyennage temporel de la lumière réfléchie avant vs après cette stimulation au cours de ces essais permet de faire apparaître la localisation spatiale du changement de réflectance le plus large, correspondant théoriquement à la colonne corticale C2 du cortex à tonneaux (**Figure M4**). La surface du crâne apparaissant de manière homogène sous lumière rouge, une image sous lumière verte ($\lambda = 530$ nm) est réalisée sans bouger la caméra afin de visualiser les vaisseaux sanguins à la surface du cortex, et y faire correspondre l'emplacement de la colonne C2 identifiée par imagerie intrinsèque. L'implant pouvait ainsi être positionné de manière à ce que la colonne C2 soit en son centre, et qu'une grande part du cortex en tonneaux soit ainsi incluse dans le champ de capture du fibroscope.

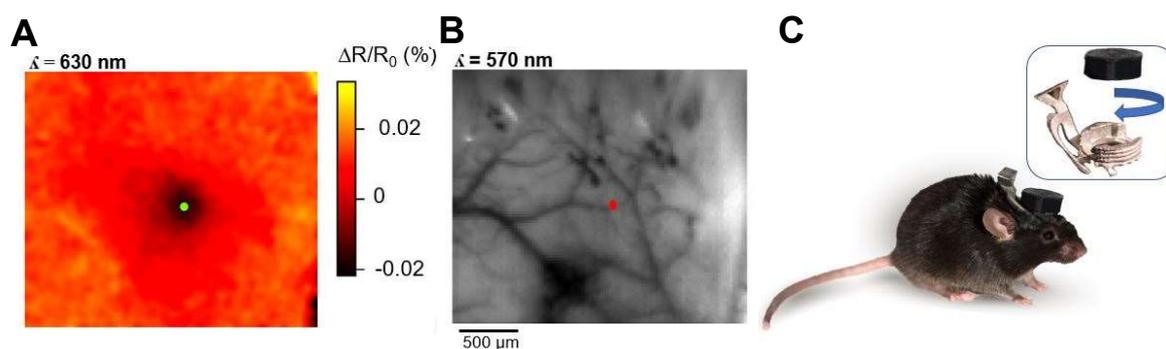


Figure M4 : Procédure d'imagerie intrinsèque pour cibler l'implantation sur vS1

A. L'imagerie intrinsèque est effectuée au-dessus du cortex somatosensoriel sur l'hémisphère gauche à travers l'os intact de l'animal illuminé en rouge ($\lambda = 630$ nm). La stimulation de la vibrisse C2 (1 s, 100 Hz) induit une activation neuronale au niveau de la zone de représentation de la vibrisse C2 qui se traduit par une diminution de la lumière réfléchiée par le cortex, mesurée par rapport à la lumière réfléchiée mesurée avant la stimulation ($\Delta R/R_0$).

B. Les coordonnées correspondant au minimum de signal sont reportées sur une image obtenue en lumière verte ($\lambda = 570$ nm) ce qui permet de centrer l'implant sur le cortex en tonneaux, en utilisant pour repères les vaisseaux sanguins de surface.

C. L'implant est par la suite solidement fixé au crâne avant d'être fermé par un bouchon de protection.

Craniotomie et pose de fenêtre

Afin d'imager le cortex vS1 des animaux durant l'exécution de la tâche de locomotion, il nous est nécessaire de réaliser un marquage préalable du tissu cortical au colorant sensible au potentiel, procédure qui implique de réaliser une craniotomie suivie d'une durectomie.

Nous avons constaté que l'anesthésie et les procédures chirurgicales nécessaires à la réalisation de ce marquage juste avant la session d'imagerie (durée d'intervention chirurgicale : 1h, récupération 1 h) avaient un impact négatif sur l'implication des animaux dans la tâche de locomotion. Un test sans intervention chirurgicale, dans les mêmes conditions d'anesthésie et de récupération, a montré que la performance des animaux n'était pas impactée par l'anesthésie seule (données non illustrées ici). La majorité de l'effet de la procédure sur le comportement est donc imputable à l'action ayant été effectuée sur les tissus.

Pour ces raisons, les craniotomies ont été réalisées plusieurs semaines en amont des sessions d'imagerie, en conservant la dura intacte, permettant la pose d'une fenêtre.

Cette craniotomie est réalisée sous anesthésie, et avec maintien de la température corporelle comme décrit dans le paragraphe relatif à l'implantation des animaux. Les animaux sont maintenus par la fixation en queue d'aronde de l'implant et un masque est apposé au niveau du museau des animaux afin de permettre l'apport de gaz anesthésiant. La craniotomie est réalisée sur une surface circulaire d'environ 5 mm de diamètre, à l'intérieur de l'implant précédemment posé. Il est pris garde durant l'ouverture de l'os de ne pas endommager la dure-mère. Une fenêtre de verre de 5 mm de diamètre est ensuite posée en compression contre le cortex et fixée avec une colle cyanoacrylate en gel sur l'extrême pourtour de la fenêtre, en évitant tout dépôt à sa surface. L'adhésion par les parois latérales de la fenêtre à l'os est importante afin de permettre ensuite le retrait de la fenêtre par traction verticale. Une fois la glue durcie, une fine couche de colle cyanoacrylate liquide est appliquée en dehors de la fenêtre afin de solidifier structurellement l'ensemble. Une vérification que le ciment posé durant l'implantation et la colle ajoutée ne gêne pas l'entrée du faisceau de fibres dans l'implant jusqu'à entrer en contact avec la fenêtre est effectuée, et le cas échéant, un fraisage des zones incriminées est effectué.

A l'issue de ces procédures un anti-inflammatoire (Meloxicam 8 mg/kg) et un antibiotique (Borgal 0,1 mg/kg) sont injectés par voie sous cutanée aux animaux 10 min avant leur réveil. Leur habitat est chauffé à l'issue de l'opération et ils bénéficient de la même surveillance post-opératoire que décrite dans le paragraphe relatif à l'implantation des animaux.

Retrait de la fenêtre et durectomie

Le jour de l'imagerie corticale fibrée en comportement, les animaux sont anesthésiés afin de procéder au retrait de la fenêtre ainsi qu'à la durectomie, préalables au marquage du cortex par le colorant sensible au potentiel (**figure M5**).

L'intérieur de l'implant est nettoyé à l'éthanol (70%) et rincé à l'eau puis séché avec des bâtonnets absorbants. Une couche de graisse au silicone (Dow Corning) est appliquée le long des parois internes de l'implant afin de prévoir un meilleur scellage de la chambre durant le marquage au colorant sensible au potentiel (décrit dans le paragraphe suivant). Un outil

constitué d'un manche miniature longiligne et d'une surface plate inférieure au diamètre de la fenêtre (outil imprimé en 3D selon nos besoins) est collé (cyanoacrylate) sur la surface lisse de la fenêtre de verre, nettoyée à l'éthanol (figure ci-contre). Une fois la colle prise (~3 minutes) un léger mouvement pendulaire circulaire permet de fragiliser la colle retenant latéralement la fenêtre et crée une possibilité d'appel d'air. Une traction verticale assez sèche permet ensuite de retirer intégralement la fenêtre. Dans l'éventualité où un morceau de la fenêtre brisée reste collé à un bord de l'os, il est retiré délicatement avec une pince. Cette approche, ne nécessitant pas de fraisage, permet de limiter l'impact sur les tissus et la durée de l'intervention chirurgicale avant la session finale d'imagerie.

Dès que la fenêtre est retirée, l'intérieur de l'implant est rempli de Ringer à ~37°C afin de prévenir l'assèchement du cortex. Le cas échéant, d'éventuelles petites repousses osseuses sont retirées à l'aide d'une pince fine en prenant garde à ne pas endommager le cortex. L'identification de la dure-mère peut être aidée par la disposition d'une source de lumière de manière rasante, faisant apparaître des reflets nacrés caractéristiques. Une aiguille chirurgicale à bout courbé et une pince fine sont utilisées respectivement pour ouvrir et retirer la dura, en prenant une fois de plus garde à pas endommager le cortex ni provoquer des saignements, affectant la qualité du marquage subséquent.

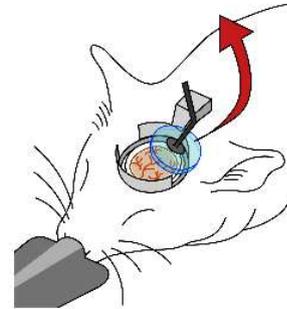


Figure M5 : Outil pour ouverture de fenêtre crâniale.

Schéma illustrant l'outil, la configuration de l'implant sur le crâne ainsi que la craniotomie interne à l'implant. La forme de l'outil permet d'exercer une force de traction ou de rotation afin de retirer les fenêtres crânielles.

Marquage au colorant sensible au potentiel chez l'animal éveillé

Dans l'optique de réduire la durée de l'anesthésie et d'éviter de nécessiter d'une période de récupération entre la fin du marquage et le début des enregistrements d'imagerie sensible au potentiel, nous avons mis en place un processus de marquage éveillé. Ce marquage peut avoir ainsi lieu en même temps que la période de réveil et de récupération d'une heure.

Dès la procédure d'ouverture de la fenêtre achevée, le liquide présent dans l'implant est précautionneusement vidé à l'aide d'une micropipette. Une chambre hermétique en résine flexible (imprimée en 3D à façon) est apposée dans l'implant des animaux et maintenue par un écrou plastique (à façon) se vissant sur le filetage de l'implant. Elle est ensuite rapidement remplie de solution chargée de colorant sensible au potentiel (RH1691 1mg/ml) par un orifice puis celui-ci est scellé à l'aide d'un élastomère silicone à polymérisation rapide (Kwik-Cast).

Une fois la chambre apposée et remplie de colorant et juste avant le réveil des animaux, un mélange de 0.2 ml d'anti-inflammatoire (Métacam 2 mg/ml) et de glucose (25 mg/ml) est injecté aux animaux. Ils sont ensuite placés dans une cage de réveil chauffée et dont le sol a été couvert de papier absorbant, dans laquelle ils restent 1h et leur récupération est surveillée.

A l'issue de cette période d'1h, l'animal est fixé par son implant, la chambre est retirée, et un lavage (5 min) est effectué dans l'implant avec une solution de Ringer à ~37°C. Une solution d'agarose est préparée et refroidie jusqu'à environ 37°C. Cette solution est appliquée dans la fenêtre sur le cortex, puis le faisceau de fibres optiques est immédiatement descendu dans la cavité de l'implant jusqu'à toucher l'os ou le ciment dentaire au fond de l'implant. Ce processus doit être réalisé tant que l'agarose est liquide. Il est pris garde lors de cette étape à ce que le faisceau de fibres optique soit positionné de manière à obtenir une image du cortex sur le capteur telle que : antérieur = haut, médial = droite. L'agarose une fois solidifié permet de limiter les artefacts de mouvement aux bords du champ de vision du faisceau de fibres. Ces artefacts sont dus aux mouvements du tissu cortical durant la locomotion qui induisent des décollements et recollements des bords de l'œdème cortical contre le faisceau de fibres, faisant largement varier la quantité de photons de fluorescence localement capturés selon la distance du tissu au faisceau de fibres (tel qu'illustré sur la **figure M6** ci-dessous).

La vis sans tête de l'anneau est ensuite serrée contre la fibre puis l'écrou est à son tour serré contre l'anneau afin de verrouiller l'ensemble de manière rigide. La session alliant suivi du comportement et imagerie corticale fibrée peut finalement débuter.

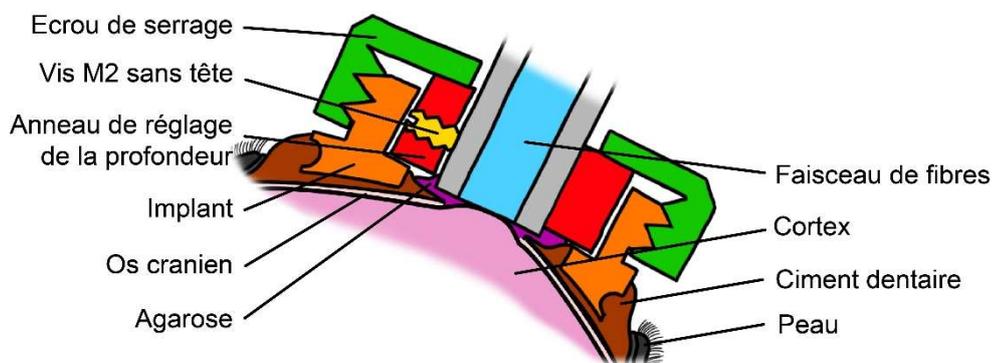


Figure M6 : Organisation des éléments constitutifs de l'implant durant l'imagerie corticale fibrée

Vue en coupe du crâne et du cortex d'une souris surmonté des éléments de l'implant permettant la fixation du faisceau de fibres et la limitation des artefacts de mouvement durant une session d'imagerie sensible au potentiel.

Acquisition des données d'imagerie fibrée

Calendrier expérimental pour la réalisation d'imagerie corticale fibrée

Maintenir un bon état physique du cortex et une bonne asepsie en refermant le crâne après avoir pratiqué durectomie, marquage et imagerie est difficile, rendant la réalisation de marquages et de sessions d'imagerie répétées chez le même animal un processus complexe. Pour ces raisons, nous avons réalisé une unique session d'imagerie sensible au potentiel par animal, lors de laquelle celui-ci est présenté pour la première fois aux omissions de l'obstacle auquel il a été habitué à faire face.

La résultante de cette contrainte ainsi que des autres contraintes chirurgicales et techniques mentionnées dans les paragraphes précédents nous ont amené à appliquer le programme expérimental tel que présenté dans la **figure M7** ci-dessous.

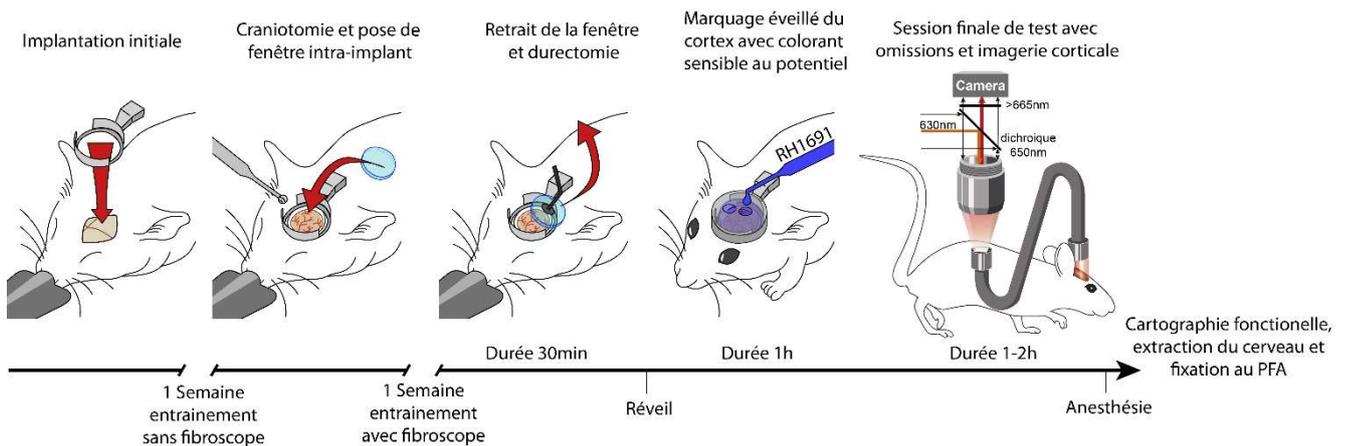


Figure M7 : Calendrier expérimental pour un groupe d'animaux

Schéma faisant figurer les procédures et les intervalles associés au cours du temps de gauche à droite. L'implantation avec imagerie intrinsèque des réponses évoquées à la stimulation de la vibrisse C2 est réalisée la première semaine. Un entraînement dans l'arène comportementale sans fibre est effectué durant 1 semaine à raison de soit 2 sessions de 20 min ou 100 essais maximum, soit 1 session de 40 min ou 200 essais maximum. La fin de la première semaine suffit généralement à dépasser 6 récompenses par minute. Les animaux n'atteignant pas cette performance sont écartés du protocole expérimental. La craniotomie et pose de fenêtre est réalisée sur les animaux restants. Un entraînement avec la fibre optique et le MORJ est suivi durant au moins une semaine. Une fois les animaux ayant des performances stables, une session d'imagerie, suivie des étapes de cartographie fonctionnelle décrites ci-après, est réalisée (pour un animal par jour, les autres animaux restants inclus dans le protocole continuant d'être entraînés la moitié de journée restante).

Déroulement des sessions imagerie fibrée en comportement

La session d'enregistrement se déroule telle que lors des sessions d'entraînement à l'exception de quelques changements :

Des omissions de l'obstacle sont introduites durant la session à partir du 30^e essai, de manière pseudo-aléatoire (10% d'essais omissions, randomisés par blocs de 10 essais).

Les séquences d'imagerie corticale fibrées sont capturées simultanément avec la séquence d'imagerie comportementale rapide, à 500 Hz, et durant 1 seconde, elles sont déclenchées par le détecteur infra-rouge situé à l'entrée de l'allée rectiligne de l'arène. Préalablement à chaque acquisition, le passage des animaux devant un second faisceau infra-rouge présent un peu en amont de cette allée, entraîne une séquence de préparation à l'enregistrement cortical. Cette séquence comprend tout d'abord un verrouillage rapide du joint optique motorisé décrit dans l'article de méthodes précédemment inclus, en face de la position de référence réglée au début de la session par l'expérimentateur. Une fois ce verrouillage effectué, un signal va déclencher l'ouverture de l'obturateur permettant à la lumière d'excitation à 630 nm de parvenir au cortex via le faisceau de fibres optiques, toujours en avance du déclenchement de l'acquisition d'images. Cette pré-illumination permet de réduire l'impact du phénomène de photoblanchiment à court terme (réversible) qui entraîne une décroissance exponentielle du signal lors du début d'une période d'excitation des fluorophores, afin que la séquence d'acquisition se déroule dans la phase de plateau de cette décroissance. Si toutefois le temps entre le déclenchement les deux barrières infrarouges venait à dépasser un certain seuil, réglable, variant de 2 à 4 secondes selon les sessions, la lumière d'excitation était coupée, afin de limiter le photoblanchiment à long terme (irréversible) et d'éviter tout effet potentiellement phototoxique lié à une exposition prolongée à la lumière. Le joint optique était alors déverrouillé et reprenait le suivi de la rotation des animaux, l'essai ne donnait alors pas lieu à un enregistrement de l'activité corticale.

La vérification de la synchronie entre les séquences d'imagerie corticale et les séquences d'imagerie rapide du comportement est effectuée grâce à la sauvegarde par le système d'acquisition de l'imagerie corticale d'une copie du signal envoyé au système de déclenchement image par image du comportement.

La session se poursuit sans limite stricte, jusqu'à être arrêtée par l'utilisateur, lorsque la quantité d'eau bue par les animaux entraîne une chute de motivation et qu'ils cessent de s'engager dans de nouveaux essais.

Cartographie fonctionnelle du cortex à l'issue de la fibroscopie

Directement suite à la session d'imagerie corticale pendant la tâche de locomotion, les animaux sont anesthésiés à l'aide d'un masque et d'anesthésique gazeux (isoflurane induction 3% 2 L/min, maintien 1-2% 0.5-1 L/min) à proximité de l'arène de comportement, sans que le faisceau de fibres ne soit détaché. Les animaux sont fixés par la partie en queue d'aronde de l'implant dans un demi-cylindre de contention, et une fois endormis, une des macro-vibrisses est identifiée et introduite dans un tube fixé à un stimulateur piézo-électrique. Ce stimulateur est déclenché de manière régulière au cours de ~20 à 40 séquences d'images d'une seconde à 500 Hz. Le moyennage temporel de fluorescence avant vs après cette stimulation au cours de ces essais est utilisé afin de visualiser la localisation de la colonne corticale correspondant à la vibrisse stimulée. Une fois ce processus réalisé, il est répété pour au moins 3 vibrisses au total, permettant d'aider le recalage de la carte anatomique obtenue par la suite (voir **figure M7**).

Cartographie anatomique du cortex

A l'issue de la session et de la cartographie fonctionnelle du cortex, les animaux alors anesthésiés par voie respiratoire reçoivent une dose létale de pentobarbital sodique (140 mg/kg par voie intrapéritonéale). Une perfusion transcardiaque au paraformaldéhyde (PFA, 4%) est alors réalisée pour fixer, via le système vasculaire, le cerveau des souris. Le système vasculaire étant rincé au préalable avec une solution saline (NaCl 0.9%) afin d'évacuer les érythrocytes des vaisseaux, ceux-ci pouvant par la suite perturber le processus de registration logicielle du tissu cortical en obstruant les vaisseaux transversaux à ces tranches. Le cerveau est enfin extrait et post-fixé dans une solution de PFA (4%) durant 1 nuit.

Des coupes tangentielles du cortex (épaisseur 100µm) sont réalisées depuis la surface du site marqué, et sont colorées à l'aide de cytochrome oxydase - diaminobenzodine permettant de visualiser les tonneaux du cortex somatosensoriel primaire des souris. Les images de chacune de ces coupes corticales sont ensuite réagencées (rotation et inversion si la tranche s'avérait être à l'envers lors de la capture) en prenant en compte la forme des tranches et les vaisseaux sanguins pénétrants par un logiciel (Perronnet *et al.*, 2016).

Enfin, les clichés obtenus par imagerie fibrée sont réalignés manuellement avec la carte des tonneaux ainsi obtenue à l'aide à la fois des centroïdes d'activité évoquée par la situation des vibrisses et des vaisseaux de surface visibles sur l'imagerie fibrée (voir **figure M8**).

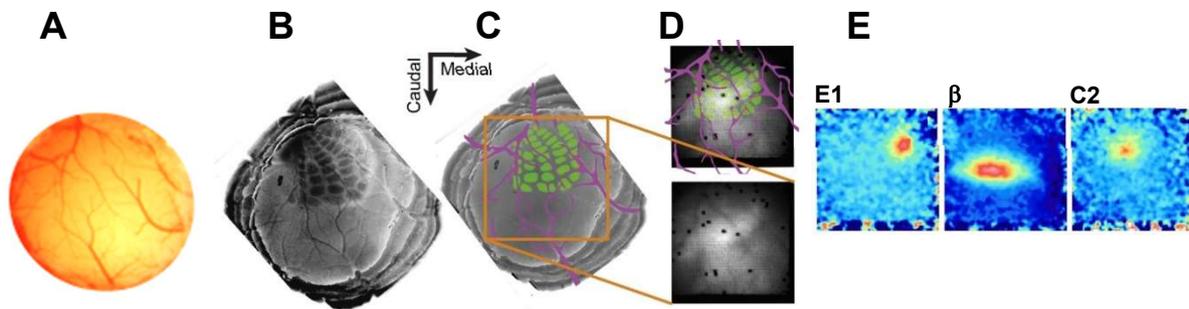


Figure M8 : Cartographie anatomo-fonctionnelle du cortex par rapport au champ d'imagerie fibrée.

- A. Image des vaisseaux pris lors de l'ouverture de la fenêtre.
- B. Image des tranches corticales superposées et alignées, avec le détournage des colonnes de chaque tranche apposée à la surface.
- C. Image colorisée manuellement avec les colonnes en vert et les vaisseaux de surface du cortex visible sur les tranches en magenta.
- D. Image du cortex par fibroscopie avec et sans superposition des colonnes et vaisseaux colorisés.
- E. Images issues de la moyenne des activités évoquées par la stimulation (successive) des vibrisses E1, b et C2 obtenues à l'issue de la session de comportement, sous anesthésie, à travers le fibroscope resté en place (échelles de couleurs arbitraires).

Traitement et analyse des données d'imagerie corticale

Soustraction de la fluorescence

Les données d'imagerie corticale sont prétraitées avant les analyses afin d'observer les variations de fluorescence par rapport à une image de référence, dont le choix varie en fonction des analyses effectuées. Pour chaque pixel d'une image de valeur F au cours d'une séquence,

sa valeur $\frac{\Delta F}{F_0}$ est calculée telle que : $\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F - F_0}{F_0}$.

L'image de référence choisie est composée de l'image à la localisation temporelle souhaitée, moyennée avec l'image précédente et l'image suivante. Ceci prévient des variations dues à un

bruit temporel à haute fréquence d'affecter localement toutes les images de fluorescence soustraites.

Masquage des zones présentant des variations artéfactuelles imputables au mouvement du tissu cortical

Lors de l'acquisition, il peut résulter des zones présentant une grande quantité d'artefacts de mouvement, visualisables par un haut niveau de variabilité au cours du temps des pixels constamment dans les séquences. Dans ce cas, un masque spatial excluant ces zones d'artefact de mouvements (*MaskAM*) est dessiné sur les séquences d'images afin de ne conserver que les zones dans lesquelles les dynamiques de fluorescence sont stables en dehors de périodes d'activité de larges populations neuronales.

Suppression du photoblanchiment à court terme

Il peut également résulter dans les séquences capturées une éventuelle dynamique de décroissance exponentielle due au photoblanchiment à court terme. Une moyenne spatiale au cours du temps sur la surface interne au *MaskAM* est réalisée. Les valeurs de cette décroissance sont filtrées (passe-bas, 1.5Hz, ordre 3) puis ces valeurs sont ajustées à une fonction de décroissance exponentielle. L'ajustement trouvé pour chaque image est ensuite soustrait de manière homogène à cette image afin d'obtenir une séquence d'image dépourvue de cette composante exponentielle.

Quantification des profils de fluorescence

Afin de catégoriser les motifs d'activité survenant au cours des essais, nous avons utilisé la carte des tonneaux, obtenue grâce aux étapes de cartographie histologique et d'imagerie fonctionnelle anesthésiée (**figure M8**). Chacun de ces tonneaux est utilisé comme région d'intérêt afin d'extraire une moyenne spatiale sur cette région, de la variation de fluorescence au cours du temps.

Le cas échéant, certains tonneaux sont exclus des analyses lorsqu'un faible rapport signal sur bruit est constaté sur une majorité des essais. Le plus souvent, ceci tient au fait que la région d'intérêt du tonneau se trouve proche de la périphérie du champ imagé (voir **figure M6**).

Traitement et analyse des données d'imagerie du comportement

Suivi logiciel des trajectoires des souris en comportement

Le bout du museau des souris a été utilisé comme point de référence pour calculer la trajectoire des souris dans l'allée rectiligne de l'arène. Plusieurs stratégies ont été adoptées pour reconstruire cette trajectoire. Nous avons principalement utilisé deux marqueurs rétro réfléchifs, ou deux mini diodes infrarouges (850 nm) lors de l'utilisation du fibroscope, positionnés sur l'implant des animaux. Lorsque les marqueurs utilisés étaient des surfaces rétro-réfléctives (comme sur les **figures M2 et R1**), dont la réflexion est sélectivement orientée vers la source, un anneau lumineux (850 nm) était positionné autour de l'objectif de la caméra d'imagerie rapide du comportement pour leur illumination. La position du bout du museau et l'angle de la tête de la souris étaient ensuite recouverts par triangulation, image par image, sur la base de la position de ces marqueurs, en supposant que les variations de l'angle de la tête de l'animal par rapport au plan horizontal étaient négligeables lors du passage des animaux dans l'allée centrale.

Nous avons également utilisé dans certains cas un outil logiciel basé sur l'apprentissage par transfert avec des réseaux neuronaux profonds (DeepLabCut, Mathis et al., 2018) pour détecter la position du bout du museau des animaux au cours de leur passage dans le champ de la caméra rapide.

Quantification des dynamiques vibrissales

Afin de quantifier les mouvements vibrissaux des animaux en mouvement, nous avons dû réaliser un changement de référentiel des images pour passer du champ fixe de la caméra, à un champ de référence centré sur la tête des animaux au cours du temps. La stabilité de ce changement de référentiel affecte directement celle de la quantification des mouvements vibrissaux. En particulier, puisque nous avons un champ de vision large permettant de suivre les souris dans l'ensemble de l'allée centrale, la quantité de pixels qu'occupe une vibrisse est fortement limitée, augmentant la nécessité d'un suivi à faible « bruit » de la position et de l'angle de la tête des animaux. Ce changement de référentiel a été réalisé à partir de la position du bout du museau et de l'angle de la tête de la souris obtenus comme décrit dans le paragraphe ci-dessus.

Les images ainsi réalignées ont ensuite été traitées par le logiciel Whisk (Clack *et al.*, 2012) qui extrait les positions des vibrisses. Les angles et courbures étaient recalculées à partir d'ajustements de polynomiaux depuis les données en sortie de Whisk. Il a été nécessaire d'utiliser le logiciel de labellisation DeepLabCut afin de corriger avec fiabilité l'identité attribuée aux courbes détectées via Whisk. Cette identification individuelle nous a permis d'obtenir un suivi au cours du temps de la courbure et de l'angle sans brusques variations résultant d'une mauvaise attribution de l'identité des vibrisses. Afin que cette attribution soit réalisée avec succès, nous avons dû couper les vibrisses des animaux à l'exception d'une rangée, la rangée C. Le choix de la rangée C résulte d'un compromis entre le fait de couper les vibrisses les plus ventrales, faisant contact de manière répétée avec le sol, et les vibrisses les plus dorsales du champ de palpation mystacial des souris. Les macro-vibrisses les plus courtes et antérieures ainsi que les micro-vibrisses restent indétectables dans nos conditions de résolution spatiale et champ de vision. Les données d'angle et de courbure manquantes entre un faible nombre d'images sont interpolées à partir de leurs voisines. Lorsque la quantité de données manquantes dépasse un seuil de 20%, la totalité des données relatives à l'essai sont écartées des analyses.

La seconde technique de suivi des vibrisses, mise au point par Max-Chalabi dans l'équipe, permet d'extraire l'angle relatif du faisceau de vibrisses au cours du temps, et ne requiert pas la coupe des vibrisses. Le même référentiel stabilisé autour du museau des animaux que pour la technique précédente est utilisé. Une courbe représentant le contour de leur museau est automatiquement extraite grâce à la binarisation de l'image (**figure R8 A**). Cette courbe est décalée du museau d'une distance fixe, puis l'intensité des pixels le long de cette courbe est quantifiée image par image. Les pics négatifs dans ce profil de luminance correspondent aux contours sombres des vibrisses sur le fond lumineux homogène. L'ensemble des pics détectés sont appariés avec les pics des images suivantes, par segments de 4 images, basés sur la position et la valeur des pics. Cette fenêtre de 4 images est décalée image par image afin d'obtenir des segments superposés dont la tendance traduit avec fiabilité la variation de l'angle du faisceau, indépendamment de la non-détection de pics individuels correspondant à une vibrisse, d'une image à la suivante.

Résultats

Nous avons mis en place un appareillage permettant de capturer les dynamiques corticales par imagerie fibrée simultanément à l'imagerie rapide du comportement de souris engagées dans une tâche de locomotion guidée par les vibrisses. Cette tâche comportementale a pour vocation de rendre prédictibles certains contacts vibrissaux générés par des obstacles présents sur le parcours des animaux. Lors des sessions finales d'imagerie corticale réalisées chez des animaux experts, 10 % d'essais dit d'« *omission* » étaient introduits, dans lesquels un obstacle habituellement présent sur le parcours de l'animal était retiré, créant un écart entre la prédiction sensorielle et l'expérience vécue par l'animal. Notre but était ainsi de favoriser et tester l'observation de corrélats neuronaux de la prédiction sensorielle tactile, et d'éventuelles erreurs de prédictions, dans le cortex vS1.

A cette fin, j'ai mis au point un dispositif comportemental, plongé dans l'obscurité, qui permet le positionnement d'obstacles dans une allée rectiligne, et la modification de leur position entre deux essais, sans que les animaux n'aient la possibilité de connaître la position de ces obstacles avant un contact physique avec ceux-ci.

Tâche d'évitement d'obstacles « statiques » : favoriser la prédictibilité des entrées sensorielles tactiles

Nous avons tout d'abord opté pour un protocole expérimental dans lequel l'obstacle est présenté systématiquement à la même position d'un essai dit « *standard* » à l'autre, faisant ainsi le choix de maximiser la prédictibilité des contacts vibrissaux au cours de la navigation dans l'allée rectiligne de l'arène. Cette tâche, dite « *statique* », est référée ainsi dans le reste de ce manuscrit.

Un obstacle était présent à la droite des animaux de façon à pouvoir étudier le traitement de l'information liée aux contacts vibrissaux avec celui-ci dans le cortex vS1 de l'hémisphère gauche, contralatéral aux vibrisses ayant contacté cet obstacle. Afin d'éviter que les animaux n'optent pour une stratégie d'évitement consistant à passer en trajectoire rectiligne par la gauche de l'allée centrale afin d'éviter l'obstacle à droite, sans avoir besoin d'adapter leur trajectoire par rapport à lui, nous avons disposé un second obstacle à la gauche des animaux, en amont du premier. Ces deux obstacles forçant les animaux à décrire une trajectoire en « S » pour traverser l'arène (**figure R1-A et B**).

Les composantes sensorielles et motrices des dynamiques vibrissales étaient généralement extraites à l'aide de la mesure de leur variation de courbure et d'angle, respectivement. Afin de quantifier ces variables, nous avons fait le choix de couper certaines de ces vibrisses. Nous avons dans un premier temps entraîné les animaux à apprendre le fonctionnement du dispositif expérimental à raison de deux sessions par jour, limitées à 20 minutes ou 100 essais. Après environ une semaine, les souris obtenaient au moins 6 récompenses par minute (**figure R1 C – phase 1**). Ensuite, toutes les vibrisses ont été coupées à ras (renouvelé tous les deux jours), à l'exception de la rangée C, permettant d'éviter le chevauchement des vibrisses sur les enregistrements comportementaux, facilitant leur suivi individuel, nécessaire à l'extraction des données de courbure et d'angle susmentionnées. Les animaux étaient ensuite entraînés une semaine supplémentaire dans cette condition, durant laquelle nous avons observé que la coupe des vibrisses avait peu d'impact sur la capacité des souris à recevoir des récompenses. À la fin de cette phase, la médiane se situait en effet au-delà de 9 récompenses par minute (**figure R1 C – phase 2**). Les souris ont été entraînées par la suite avec le faisceau de fibres optiques fixé à leur implant avec le joint optique rotatif accompagnant leur rotation (**figure R1 C – phase 3**). La performance des animaux les moins actifs lors de la phase 2 (souris 21 et 22), était initialement fortement réduite, autour de 1 à 2 récompenses par minute. Elle atteignait cependant rapidement un plateau à supérieur à 8 récompenses par minute, de manière similaire aux performances des autres animaux et de leur performance observée à la fin de la seconde phase d'entraînement. Ce groupe d'animaux étant le premier durant lequel le MORJ a été mis en place dans sa forme aboutie, le début de la phase 3 de ce groupe d'animaux a vu la mise en place de quelques ajustements du dispositif. Ainsi ces changements ont pu affecter les performances des souris 21 et 22, et pourraient expliquer partiellement cette variabilité.

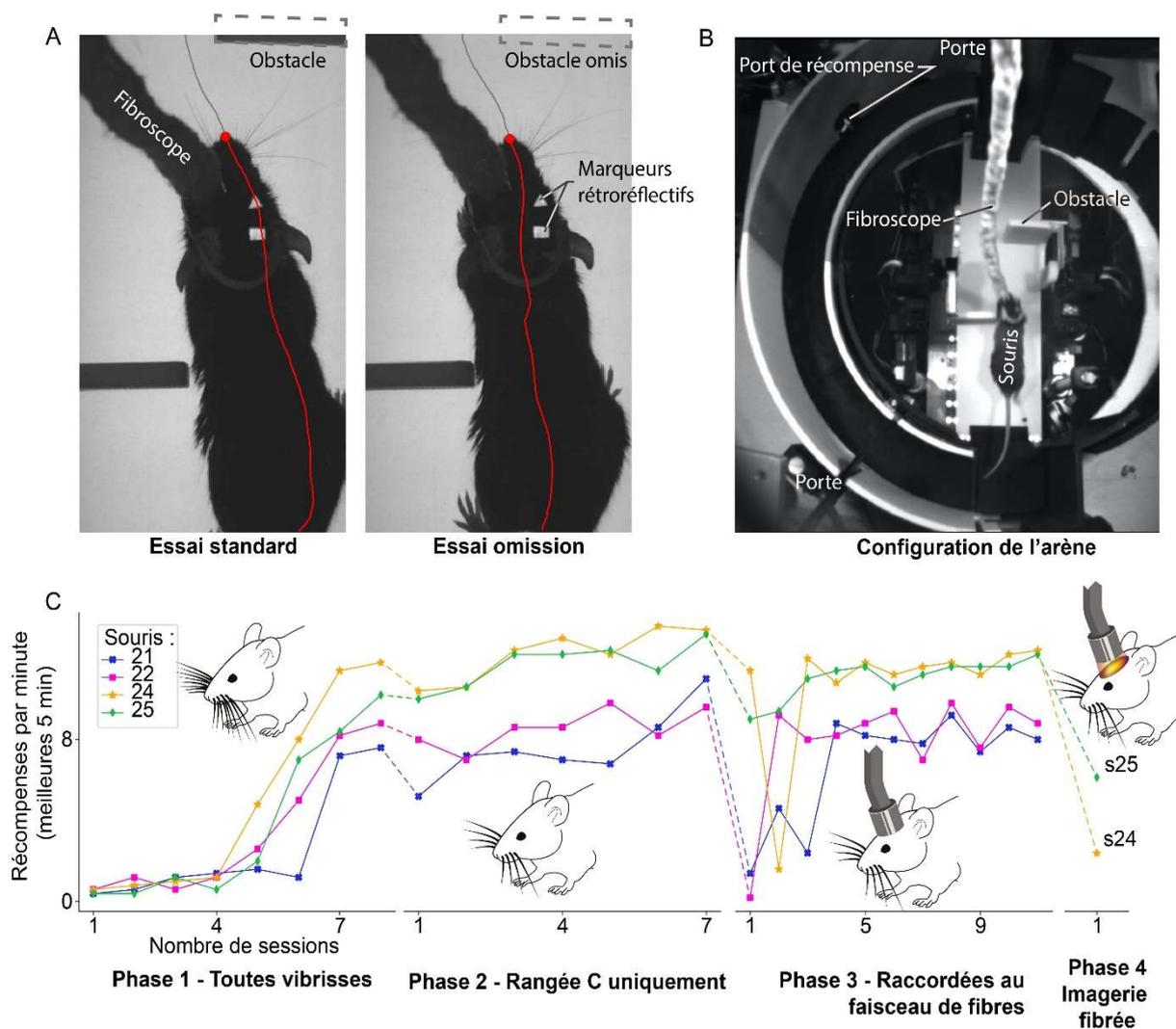


Figure R1 : Tâche d'évitement d'obstacles statiques

A. Images d'une souris au cours du passage entre les objets dans l'allée centrale. Les lignes rouges représentent les trajectoires passées, la portion grise indique la trajectoire du nez de l'animal dans le reste de l'essai. A gauche est représenté un essai standard, avec l'obstacle en haut à droite, à droite, un essai omission, sans l'obstacle en haut à droite.

B. Image plus large de l'arène et de la configuration des obstacles.

C. Meilleures performances, en récompenses par minute, calculées sur une fenêtre glissante de 5 minutes au cours de chaque session. De gauche à droite : Phase 1, souris entraînées sans être attachées par la fibre, et avec toutes leurs vibrisses. Phase 2, souris entraînées après la coupe de toutes les vibrisses à l'exception de celles de la rangée C. Phase 3, suite de l'entraînement avec le fibroscope fixé à l'implant et le MORJ actif. Phase 4, session d'imagerie fibrée.

Enfin, l'imagerie corticale fibrée est réalisée durant la session finale, à une cadence de 500 Hz, synchronisée à l'imagerie du comportement des animaux. C'est également lors de cette session que nous introduisons pour la première fois les omissions dans le protocole, à raison de 10% des essais, après 30 essais standards initiaux (**figure R1 C – phase 4**). Cette dernière session impliquant des contraintes liées à la chirurgie permettant d'appliquer le colorant sensible au potentiel le jour même de l'expérience, les performances étaient réduites pour tous les animaux. Seules les souris 24 et 25 ont effectué un nombre d'essais supérieur à 30 durant toute la période d'imagerie, suffisant pour introduire des omissions. A nouveau, ce groupe étant le premier pour lequel l'imagerie fibrée en comportement a été réalisée, l'ensemble des techniques visant à réduire l'impact des procédures chirurgicales sur le comportement des animaux n'étaient alors pas abouti. Spécifiquement pour ce groupe : le processus de craniotomie et durectomie durant une heure, a été réalisé directement avant la session d'imagerie, alors que les animaux étaient anesthésiés. Un marquage au colorant sensible au potentiel, sous anesthésie durant un heure a suivi, puis une fois réveillés, les animaux ont eu une période de récupération d'une heure supplémentaire, durant laquelle ils furent attachés au faisceau de fibres optiques, avant de démarrer l'enregistrement cortical en comportement.

Dynamiques spatio-temporelles de l'activité dans le cortex vS1 au cours de la tâche de locomotion

A l'issue de l'entraînement et des sessions d'imagerie fibrée, une de ces souris, #25, a maintenu une performance supérieure à 50% de sa performance durant les sessions d'entraînement finales, ainsi qu'une trajectoire rapide et stéréotypée dans l'allée centrale, au cours de 211 essais, dont 190 essais durant lesquels l'activité corticale a été enregistrée, pendant une session de 58 minutes (seuls ces 190 essais sont donc considérés dans les analyses subséquentes). Nous avons ainsi choisi de cibler nos analyses sur cette session. Les résultats présentés ici doivent donc être considérés comme préliminaires car ces expériences n'ont pas eu l'occasion d'être répétées à l'identique sur un plus grand nombre d'animaux.

Un motif d'activité de grande amplitude apparaît nettement dans les multiples régions d'intérêt correspondant aux tonneaux du cortex somatosensoriel primaire, illustré dans les trois essais représentatifs sélectionnés (**figure R2**). La variation de fluorescence au cours de cette activité culmine à environ 1% et est distribuée sur la totalité des tonneaux du cortex vS1 (**figure R2 A-B**). Cette dynamique d'activité s'est manifestée dans une large quantité d'essais, et est relativement reproductible temporellement, avec une composante transitoire d'environ 70 ms,

suivie d'une période prolongée de maintien d'un niveau augmenté de fluorescence. Spatialement, l'évolution de la phase transitoire se comporte comme une « vague », se propageant de proche en proche dans le tissu cortical, sur la totalité de la surface imagée (**figure R2 C**). Cette large vague d'activité transitoire ne débute visiblement pas dans le cortex à tonneaux lors de la majorité des essais. Antérieurement à l'arrivée de cette vague dans vS1, l'activité neuronale s'intensifie simultanément dans les aires attenantes latéralement et médialement. Ces vagues se déplacent ensuite vers les aires postérieures, au-delà de vS1.

Par ailleurs, des « foyers » d'activité, plus localisés dans l'espace, et dont la variation maximum se trouve être de moindre amplitude que les vagues décrites ci-dessus, sont détectés au cours de certains essais. Ces activités émergent dans vS1, et étant très localisées, sont détectées dans certains tonneaux uniquement (**figure R3**).

Ces deux types d'activité que nous appellerons respectivement « vagues » et « foyers », affectent ainsi spatialement, temporellement et quantitativement le tissu cortical de manière différente. Nous avons donc choisi de séparer leur étude, et pour lier ces événements au comportement de l'animal, nous avons automatisé leur détection selon la procédure décrite ci-après.

Pour chacun des profils de fluorescence extrait à partir d'une colonne corticale donnée, le signal est filtré (filtre passe bas, 27.5 Hz) puis les pics d'activité sont identifiés selon les critères suivants :

- *vagues* : proéminence > 0.3%, hauteur du pic > 0.25%, largeur du pic entre 14 et 60 ms, détection observée dans au moins 6 colonnes corticales (intervalle inter-pics < 10 ms).
- *foyers* : proéminence > 0.1%, hauteur du pic < 0.5%, largeur du pic entre 20 et 100 ms, détection observée dans au moins 3 colonnes corticales (intervalle inter-pics < 30 ms).

Lorsque des événements correspondant à ces critères sont détectés, les profils concernés (issus d'au moins 6 colonnes corticales dans le cas des vagues, et d'au moins 3 colonnes dans le cas des foyers), sont moyennés ensemble sur une fenêtre temporelle de 150 ms. Depuis ces moyennes, un unique pic est à nouveau détecté, avec les paramètres dépendant du type d'activité, et sert de référence de temps unique pour ce groupe d'activité.

Il était ainsi possible de visualiser l'occurrence de ces deux types d'évènements en fonction de la trajectoire des animaux (**figure R4**).

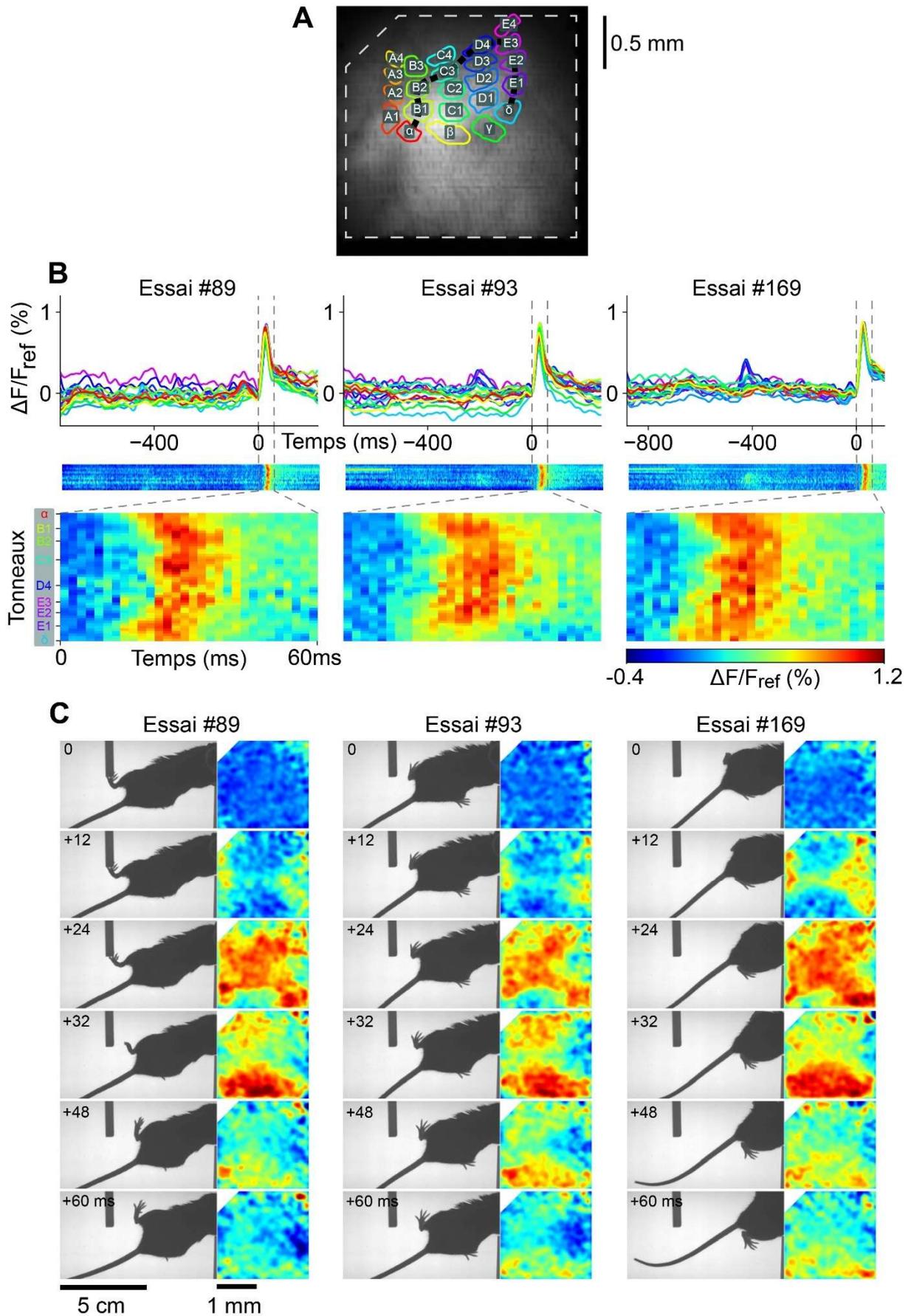


Figure R2 : Vagues de dépolarisation observées dans vS1 au cours de 3 essais représentatifs

A. Image de la fluorescence du colorant sensible au potentiel observée au niveau de vS1 à travers le fibroscope. La localisation des 23 tonneaux associés aux macro-vibrisses obtenue par reconstruction à partir des données histologiques et de la cartographie fonctionnelle est indiquée par des contours colorés. Le contour pointillé gris clair indique le masque excluant les zones non exploitables du champ utilisé pour l'analyse. La ligne pointillée noire indique la région d'intérêt utilisée pour les quantifications espace-temps présentées en B.

B. En haut sont présentées les traces temporelles de la variation de fluorescence dans les régions d'intérêt définies par chacun des tonneaux pour trois essais représentatifs (une colonne par essai). Le code couleur des traces correspond à celui des colonnes corticales montrées dans en A. En dessous sont illustrées à la même échelle les quantifications au cours du temps (axe horizontal) de la distribution spatiale (axe vertical) de la variation de fluorescence (en couleur) dans la section spatiale définie par la courbe noire pointillée illustrée en A. Cette section coupe les tonneaux alpha à delta, en passant par C3, D4 et E3, et permet de faciliter la visualisation de la direction de déplacement des vagues au sein du cortex à tonneau, au cours du temps. En bas les mêmes graphes sont présentés avec un zoom sur le motif d'activité étudié. Pour chaque essai, l'image de référence est l'image à 0 ms sur l'axe temporel.

C. Images synchronisées du comportement juxtaposées avec les images de la variation d'activité corticale par rapport à l'image de référence (première image, en haut de la série de 6). L'intervalle de temps depuis l'image de référence est indiqué sur les images de comportement.

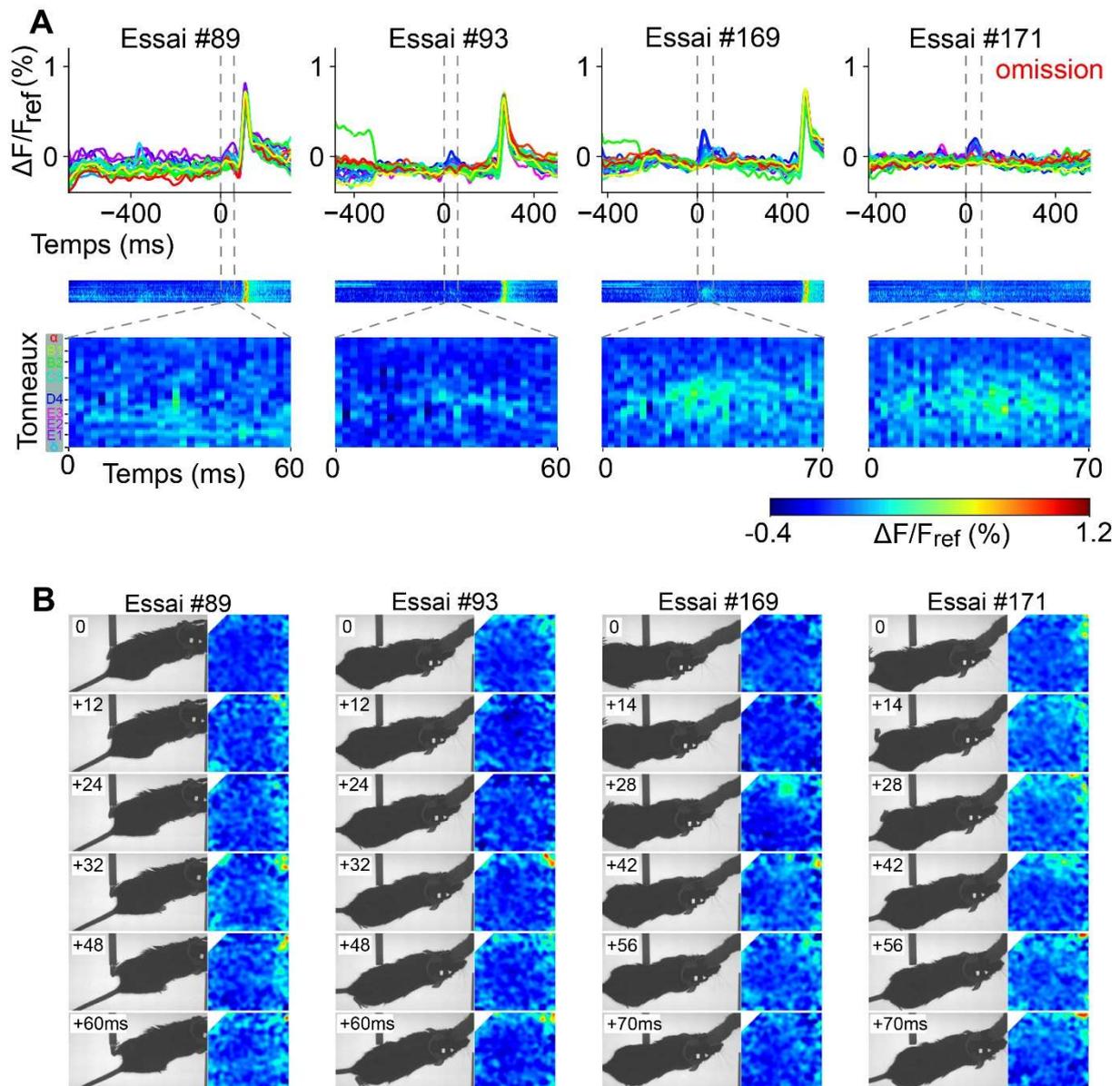


Figure R3 : Foyers de dépolarisation observés dans vS1 au cours de 4 essais représentatifs

A. Quantification des variations de fluorescence au cours de 4 essais représentatifs où des foyers de dépolarisation ont été observés (mêmes conventions de représentation que pour la figure R2). On notera qu'au cours de trois essais illustrés sur les 4 des vagues d'activité telles que décrites précédemment ont également été observées. Les foyers diffèrent des vagues non seulement par leur amplitude, mais aussi par leurs caractéristiques spatiales et temporelles.

B. Images synchronisées du comportement juxtaposées avec les images de la variation d'activité corticale par rapport à l'image de référence (première image, en haut de la série de 6). L'intervalle temporel entre chaque couple d'images est spécifié sur l'image de comportement.

De larges vagues d'activité liées à un ajustement de la locomotion

L'examen préliminaire des vidéos de l'activité corticale couplées à celles du comportement semblait indiquer que ces vagues d'activité étaient davantage liées à l'activité motrice de l'animal qu'avec les entrées sensorielles tactiles. En reportant sur les trajectoires de la souris l'occurrence de ces événements, il est apparu que la majorité des occurrences de vagues a lieu alors que la pointe du nez de l'animal se trouve au niveau de l'obstacle ou au-delà de celui-ci (**figure R2 C, R4 A**). De plus, lorsqu'une vague survient, elle est accompagnée, au niveau comportemental, par une forte décélération, aboutissant à un très bref arrêt complet voire un léger mouvement de recul (**figure R4 A, B**), suivi d'une reprise de la locomotion. Ces vagues sont ainsi simultanées à la transition d'une démarche de course vers une posture plus statique. Cette posture consiste en un positionnement synchronisé des deux pattes arrière en « éventail », observable lorsqu'elles se trouvent dans le champ de vision alors que la vague se produit. Elle contraste avec la cadence alternée du positionnement des pattes postérieures lors de la course (**voir images de comportement figure R2 C comparées à R3 B**).

De manière surprenante, cet ajustement ne semble pas systématiquement être lié à l'entrée en collision du nez avec le second obstacle. En effet, pour la moitié des essais durant lesquels une vague est détectée, soit 58 sur 122, le museau de la souris ainsi que les marqueurs positionnés sur sa tête se trouvent même en dehors du champ de vision de la caméra rapide (**voir images de comportement figure R2 C**). La localisation du bout du nez de la souris, inconnue, ne peut ainsi pas être affichée sur la **figure R4 A**, alors que la tête de l'animal a donc largement dépassé l'obstacle. Ces vagues surviennent cependant bien dans 71,3% de tous les essais standards ($n = 122/171$, **figure R4 E**).

L'analyse de la vitesse des animaux autour de l'occurrence des vagues d'activité corticale montre que ceux-ci décélèrent environ 200 ms avant la survenue d'une vague (**figure R4 B**). En focalisant notre attention sur les essais dénués de vagues (**figure R4 C**), on notera que la différence de vitesse entre la zone 1 cm avant le premier contact, et la zone 1 cm après l'obstacle y est significative lors des essais standards. Ce n'est pas le cas dans les essais omission, nous invitant à postuler que cette décélération lors du contournement de l'obstacle serait liée à la détection de celui-ci.

En accord avec ces observations, une hypothèse serait que l'inertie du faisceau de fibres dû par la course de la souris se trouve exercer une force vers l'avant durant la décélération au cours du

contournement de l'obstacle. Suite à cette décélération, le faisceau de fibres exercerait ainsi potentiellement une force de traction pouvant être perçue par la souris, d'amplitude parfois suffisante pour qu'une réaction d'ajustement moteur soit observée, afin de compenser cette légère traction. Cependant, nos observations durant d'autres sessions, suggèrent que ces brefs arrêts seraient multifactoriels, car ils n'étaient pas observés lorsque d'autres animaux se déplaçaient dans l'allée rectiligne en étant attachés au faisceau de fibres, sans avoir subi de procédure chirurgicale directement avant la session (qu'ils disposent d'une fenêtre corticale ou non). Une vue d'ensemble sur ce point est évoquée durant la discussion.

Enfin, une proportion largement plus faible d'essais omission que standard donne lieu à une vague d'activité au cours de la traversée de l'allée (**figure R4 B**). Puisque cette décélération est moins prononcée lors des essais omission, la force de « traction » du faisceau pourrait être suffisamment faible pour que la souris ne réagisse pas par le même ajustement moteur.

Pourtant, de manière surprenante, la trajectoire elle, semble identique durant les essais omission et standard, évitant un objet absent dans le cas des essais omission. Ceci suggère qu'au cours de l'apprentissage de la tâche, la souris a mémorisé le contexte spatial de la tâche, adoptant une trajectoire type, probablement corrélée à une forme de prédiction de la position de l'obstacle par la souris.

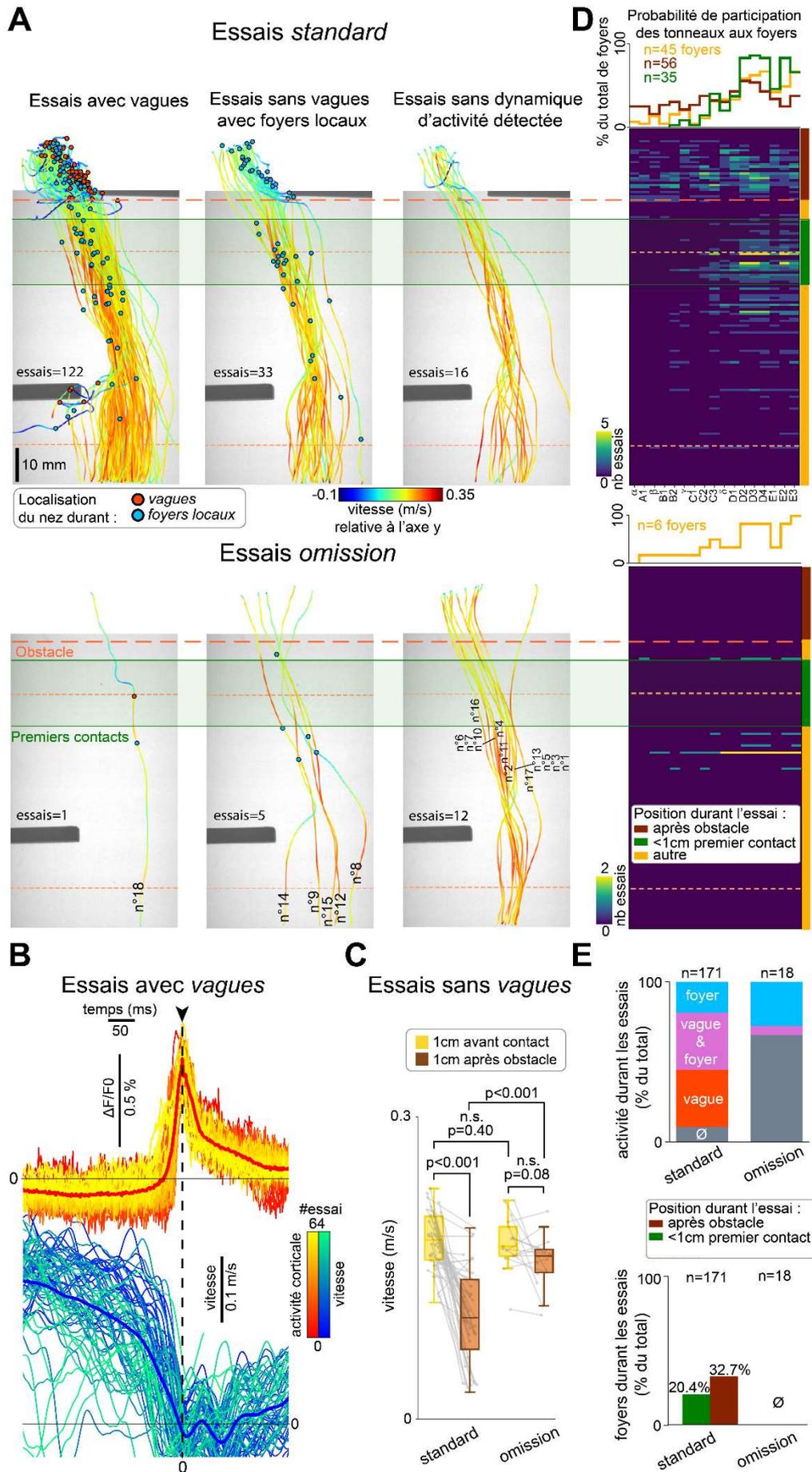


Figure R4 : Mise en lien de l'activité corticale et du contexte comportemental à l'échelle de l'essai unique.

A. Trajectoires du nez de la souris 25 (estimé à partir de la fusion des données du nez réel et de sa projection basée sur la position des marqueurs, permettant de suivre le nez en dehors de l'image) superposées à une image de l'allée centrale correspondant à la catégorie de l'essai : standard (en haut) ou omission (en bas). Les couleurs des trajectoires sont codées selon la vitesse relative du nez sur l'axe y de l'allée. La localisation du museau de l'animal lors des vagues ou des foyers est indiquée respectivement par des ronds rouges et bleus. La zone des premiers contacts vibrissaux possibles avec le second obstacle est indiquée par une aire ombragée verte. La localisation de ce second obstacle sur l'axe perpendiculaire à l'allée centrale est indiquée par une ligne orange à larges pointillés. La colonne de gauche regroupe toutes les trajectoires des essais durant lesquels une vague est détectée. La colonne du milieu regroupe les essais durant lesquels aucune vague n'est détectée mais au moins un foyer est détecté. La colonne de droite regroupe les essais durant lesquels aucune vague ni foyer n'est détecté. Le numéro de l'omission est indiqué à côté des trajectoires correspondantes.

B. Haut : Variation de fluorescence (moyenne spatiale sur la surface imagée) au cours du temps, pour tous les essais durant lesquels une vague a été détectée alors que la position du museau est identifiable ($n = 64$, traces alignées sur le moment de l'apogée de la vague indiqué par la tête de flèche noire). Bas : Variation de la vitesse du museau (calculée à partir de la position du nez projetée sur l'axe vertical de l'allée, traces alignées sur le moment de l'apogée de la vague). Les codes couleurs des traces (nuances rouge-jaune et bleu-vert) correspondent au numéro de l'essai.

C. Comparaison des vitesses moyennes durant la localisation 1cm avant la ligne de premier contact potentiel du second obstacle, et 1cm après la ligne de localisation de l'obstacle, pour les essais omission et standard. Seuls sont sélectionnés les essais ne comportant pas de vague et durant lesquels la position du bout du museau de la souris est accessible au cours des périodes spatiales comparées ($n = 43$ essais standards, 17 essais omission), Tests statistiques : Wilcoxon pour données appairées (indiqués par des lignes et points gris entre les paires), Mann-Whitney U pour données non appairées.

D. Occurrences des foyers par rapport à la localisation spatiale du museau de l'animal au moment de leur détection (axe vertical) et par tonneau impliqué (axe horizontal). La position et l'échelle de l'axe vertical correspondent à celles des images de l'allée centrale du panel A. La quantité de foyers localisés sur une même région spatiale (par section de 1.3 mm) est indiquée en code couleur. La localisation, le long de l'allée, est séparée en 3 zones d'intérêt, correspondant à : +/- 1cm autour de la ligne labellisée comme premier contact (*vert*), toute localisation se trouvant après la ligne labellisée comme « obstacle » (*marron*), et autre localisation dans l'allée centrale (*jaune*). La participation de chaque tonneau dans la totalité des foyers pour chaque zone spatiale d'intérêt est affichée sous forme d'histogramme au-dessus de chaque condition.

E. Haut : Proportion d'essais durant lesquels ont lieu vagues et/ou foyers d'activité, en pourcentage de la totalité des essais pour chaque condition. Bas : Proportion d'essais durant lesquels le museau de la souris est localisé dans la zone spatiale d'intérêt (même définition et code couleur que pour le panel D) durant la survenue d'un foyer d'activité, par type d'essai.

Des foyers locaux d'activité potentiellement liés aux entrées vibrissales ?

La distribution spatiale du positionnement de la pointe du nez de l'animal lors de l'émergence de foyers d'activités est plus étalée que pour les vagues (**figure R4 A**). A titre indicatif, la zone durant laquelle un premier contact vibrissal a potentiellement lieu avec le second obstacle durant chaque essai est indiquée par une région positionnée en avance par rapport à cet obstacle, de 5 à 25 mm de celui-ci. (Voir partie résultats « *Estimation des dynamiques vibrissales sensorielles et motrices* » pour plus d'informations concernant le positionnement de cette région).

Le nez de la souris se trouve dans la zone de premier contact alors que survient un foyer durant 20.4% des essais standards (n= 35/171, **figure R4 E**). Les tonneaux participant à ces foyers d'activité sont majoritairement les tonneaux des rangées D et E, avec une plus faible participation des colonnes corticales de la rangée C (**figure R4 D, haut**). Pour cet animal, les vibrisses de la rangée C uniquement sont préservées alors que les autres vibrisses sont coupées. Ce décalage entre l'identité des vibrisses ayant pu être défléchies et l'identité des colonnes impliquées dans la représentation de ces contacts, pourrait être le résultat d'une imprécision de l'ordre du demi-millimètre, du processus de cartographie anatomo-fonctionnelle, rendu difficile notamment du fait de la mauvaise visualisation du motif de vaisseaux sanguins à travers le fibroscope en lumière rouge.

Dans la zone de premier contact potentiel avec l'obstacle, aucun foyer d'activité n'a été détecté au cours des 18 essais d'omission (**figure R4 D bas**). Cette proportion est significativement différente de celle du nombre de foyers évoqués dans cette zone lors des essais standards (p= 0.016, Fisher exact test).

Une part des activités en foyer se trouve également survenir après que l'animal a dépassé le second obstacle (32,7% des essais, n= 56/171, **figure R4 E**), se superposant spatialement à la localisation de la majorité des vagues, que ce soit dans les essais où des vagues sont observées, comme dans les essais où ce n'est pas le cas (**figure R4 A**). Les foyers survenant quand la souris est localisée dans cette zone résultent de l'activation de multiples colonnes corticales, dont les identités semblent être différentes et plus variées que pour les foyers ayant lieu dans la zone de premier contact potentiel (**figure R3 D haut**). Ceci pourrait être dû aux larges déflexions des vibrisses ayant lieu lorsque celles-ci quittent le contact avec l'obstacle, dans un mouvement

d'accélération et d'amplitude élevées qui pourrait résulter en une activation différente des voies sensorielles afférentes.

Enfin, un groupe de foyers d'activité survient parfois alors que la souris se trouvait en amont de la zone de premier contact potentiel, au-delà de 26 mm de l'obstacle, durant les essais standards comme omission (12% des essais standards, $n = 21/171$ et 27% des essais omission, $n = 5/18$, sélection sur 10mm avant la zone de premier contact potentiel). Bien qu'il soit possible que ceux se trouvant au plus près de la zone de contact potentiel puissent correspondre à des signaux évoqués par des contacts vibrissaux avec l'obstacle (une définition plus précise de cette zone de contacts potentiels nécessiterait un suivi des contacts vibrissaux réels), ceci semble peu vraisemblable au vu de la distance les séparant de l'obstacle. De multiples hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la répétabilité de ces activités : des contacts vibrissaux avec un autre élément de l'arène (sol, ou système de présentation de l'obstacle visible sur la **figure R1 B**), un corrélat moteur, ou d'activité interne en lien avec cette position dans l'espace. Cependant, une hypothèse ayant trait au codage prédictif pourrait également être avancée : en effet, il a été montré dans le cortex visuel que dans le cas de stimulations attendues, 5,6% des neurones sélectifs à la dite stimulation peuvent répondre en anticipation de celle-ci (Fiser *et al.*, 2016). Dans notre tâche, ces activités pourraient être de même ordre, et précéder la stimulation vibrissale.

En conclusion, nous observons une activité potentiellement liée au contacts vibrissaux durant 20% des essais standards. La trajectoire des souris et leur taille implique que les vibrisses et l'obstacle se retrouvent nécessairement en contact durant un passage dans l'allée rectiligne. On pourrait ainsi penser qu'une activité liée au contact aurait été détectée dans 100% des essais. Il est possible que les réponses corticales au niveau de la population soient plus ou moins sélectives à certaines cinématiques de déflexion au cours des dits contacts, ce qui nécessiterait pour s'en assurer un suivi précis de la courbure des vibrisses au contact (voir partie correspondante à la fin des résultats pour des précisions sur le suivi des vibrisses et de la courbure). Il est cependant également possible qu'au cours de l'entraînement de la souris, la position des obstacles ait été mémorisée, rendant les vibrisses moins utiles pour adapter le comportement, la navigation idiothétique devenant alors potentiellement suffisante. Ceci pourrait à la fois expliquer le faible taux de réponses de vS1 aux contacts dans les essais standard, l'absence de signaux d'erreur lors de contacts « manquants » durant les essais

omission, et la faible quantité d'activité étant potentiellement assibilée à un signal d'anticipation.

Afin de préciser cette hypothèse, nous avons donc souhaité mesurer dans quelle mesure les entrées vibrissales étaient utilisées dans cette tâche comportementale.

Importance des entrées vibrissales pour l'exécution de la tâche d'évitement d'obstacles « statiques » chez des animaux experts

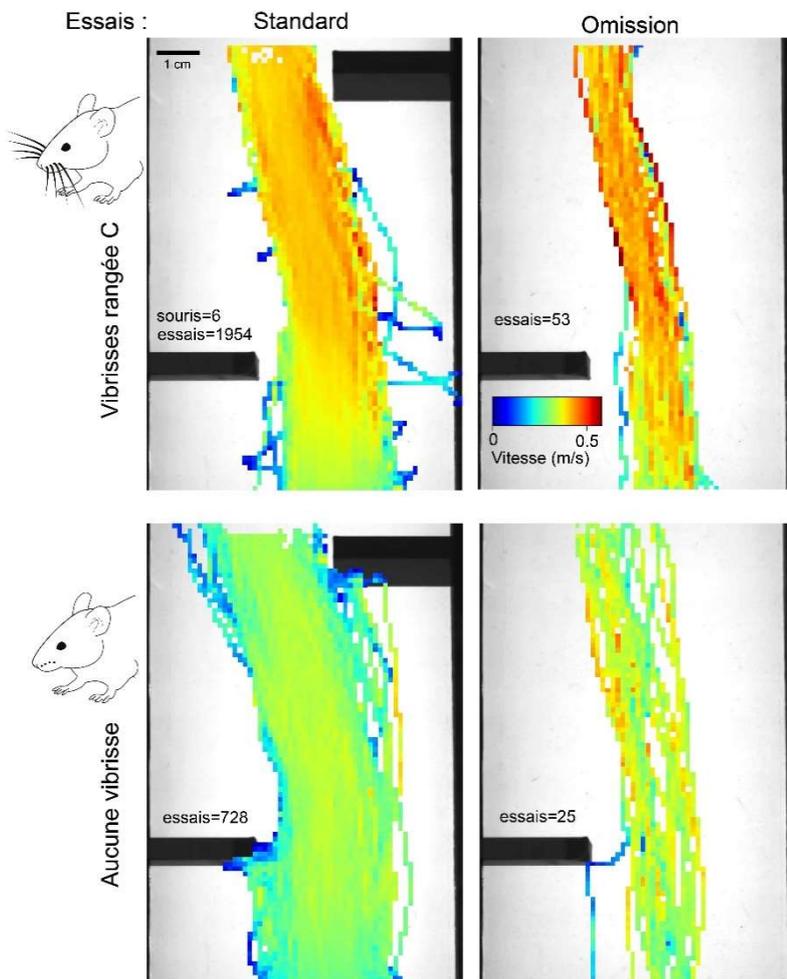
Pour évaluer combien la collection d'informations tactiles par les vibrisses restait importante pour la résolution de la tâche chez les souris expertes, nous avons analysé la manière dont la coupe des vibrisses chez ces animaux affectait leur locomotion et leur comportement à l'approche des obstacles.

Dans cet objectif, nous avons entraîné un autre groupe d'animaux à effectuer la même tâche, d'abord avec toutes, puis avec une seule rangée de vibrisses (rangée C), et enfin suite à la coupe de l'intégralité des vibrisses (durée des phases d'entraînement : respectivement 1 semaine, 1 semaine, et 2 sessions). Pour effectuer les sessions avec coupe de vibrisses partielle ou totale, une anesthésie gazeuse a été réalisée sur chaque animal pendant environ 2 minutes pour pratiquer la coupe, suivie d'une récupération d'1h avant de débiter la session). Nous avons par la suite analysé les trajectoires de ces animaux de la même manière que précédemment.

Nous avons observé que la vitesse moyenne de déplacement sur toute la longueur de l'allée était plus faible pour les sessions durant lesquelles toutes les vibrisses étaient coupées en comparaison des sessions pour lesquelles une rangée de vibrisses était intacte (respectivement 0.29 m/s contre 0.35 m/s, **figure R5 A**). Cette diminution était relativement uniforme au cours de l'allée centrale.

Lorsque toutes les vibrisses étaient coupées, la distance minimale à laquelle la pointe du nez des souris passait à proximité du premier obstacle durant un essai standard était également plus distribuée, et significativement inférieure, à celle mesurée lorsque les vibrisses de la rangée C étaient intactes (**figure R5 A, B**). Ainsi, la distance minimale avec le premier obstacle était pour 8.51% des essais standard sans vibrisses, plus petite que pour 99% des essais standards.

A Moyenne spatiale des vitesses au cours des trajectoires



B Premier obstacle Second obstacle

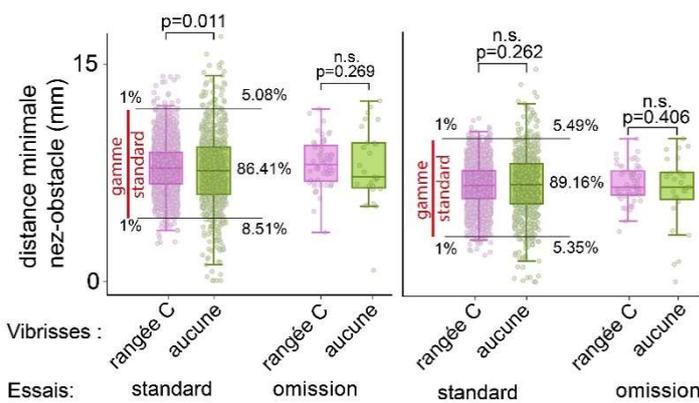


Figure R5 : Implication des vibrisses dans l'ajustement de la trajectoire des animaux.

A. Trajectoires du nez des souris (n=6) superposées à une image de l'allée centrale correspondant à la catégorie de l'essai (standard ou omission). Les couleurs des trajectoires sont codées selon la vitesse relative du nez moyennées spatialement (10 x 10 pixels). Les sessions avec les vibrisses de la rangée C intacte sont illustrées en haut, celles avec la totalité des vibrisses coupées en bas.

B. Diagrammes en boîte des distances minimales entre la pointe du nez et le premier (gauche) ainsi que le second obstacle (droite). Chaque point correspond à un essai. La « gamme standard » d'évitement de chaque obstacle est définie comme la distance du 1^{er} au le 99^e centile des distances observées pour tous les essais standards avec une rangée de vibrisses (tests statistiques entre conditions : Mann Whitney U-test).

Cette déviation est plus faible et non significative pour le second obstacle, pour lequel 5.35% des essais sans vibrisses sont plus proches que pour 99% des essais standards avec une rangée de vibrisses intacte.

Ceci suggère que les souris utilisent bien leurs vibrisses durant la tâche afin d'optimiser leur vitesse de course, mais également d'éviter les collisions avec les obstacles. Celles-ci sont cependant bien moins fréquentes avec le second obstacle lorsque les vibrisses sont coupées. Ceci s'explique potentiellement car le premier obstacle, sondé soit par les vibrisses et/ou avec le reste du corps sert probablement d'indice allothétique afin de permettre la mise à jour de la représentation de la position de l'animal.

Ceci pourrait participer à minimiser, au cours de l'apprentissage, l'erreur spatiale et temporelle entre l'éventuelle prédiction de contact avec l'obstacle et les entrées sensorielles indiquant effectivement sa localisation. Cela implique potentiellement également un effet supplémentaire : minimiser la nécessité d'obtenir des informations concernant cet obstacle, et l'attention lui étant portée.

Nous nous sommes ainsi demandé si un facteur attentionnel pourrait jouer un rôle sur le traitement cortical de l'information ascendante tactile. En effet, l'attention sélective spatiale, beaucoup étudiée dans le système visuel, est connue pour réduire le temps de réaction à un stimulus. Elle a plus récemment également été montrée avoir un effet facilitant sur le taux de décharge des neurones localisés dans le champ récepteur d'une stimulation à laquelle une attention est portée, dans le cortex visuel des souris, via des mécanismes de neuromodulation (Noudoost and Moore, 2011; Speed *et al.*, 2020).

Dans le contexte hypothétique d'une comparaison entre les entrées et les prédictions sensorielles dans vS1, ceci pourrait impliquer que lorsqu'un percept sensoriel est facilité par un état attentionnel dirigé, la prédiction associée le soit également afin que ces deux flux demeurent comparables et résultent d'une différence nulle dans le cas d'une prédiction valide.

Nous avons ainsi mis en place une version alternative de la tâche statique, dans laquelle un obstacle est présenté de façon pseudo-aléatoire soit à gauche soit à droite de l'allée rectiligne de l'arène. De cette manière l'obstacle sera ici systématiquement attendu, comme pour la tâche statique, mais la récolte d'informations tactiles devient nécessaire pour adapter la trajectoire en conséquence, indépendamment du niveau d'apprentissage de la tâche.

Dans la partie suivante sont présentés les résultats comportementaux montrant l'usage des vibrisses et les capacités d'adaptation de la locomotion à l'approche de l'obstacle dont la position latérale (droite ou gauche) n'est pas prédictible, mais dont la position le long de l'allée droite est attendue. J'y présenterai également une analyse préliminaire des données neurophysiologiques obtenues dans le cadre de cette seconde tâche comportementale.

Tache d'évitement d'un obstacle « dynamique » : renforcer la saillance des entrées sensorielles tactiles

Dans cette seconde version de la tâche de locomotion, dite « *dynamique* », un unique obstacle est systématiquement présent à chaque essai au même niveau de l'arène comportementale, mais sa position, à droite ou à gauche de l'allée, varie de manière pseudo-aléatoire entre chaque essai (blocs de 8, 50/50%).

L'analyse comportementale de cette nouvelle tâche a à nouveau été réalisée, pour un second groupe d'animaux entraînés à optimiser leur trajectoire avec toutes leurs vibrisses, puis une rangée uniquement (rangée C), et enfin, sans vibrisses (durée des phases d'entraînement : respectivement 1 semaine, 1 semaine, et 2 sessions). Durant les sessions avec coupe des vibrisses partielles ou totales, une anesthésie gazeuse a été réalisée sur chaque animal environ (2 minutes pour pratiquer la coupe, suivie d'une récupération d'1h avant de débiter la session).

Comme pour la tâche précédente, il apparaît que la vitesse des animaux est plus importante pour les sessions avec une rangée de vibrisses, comparativement aux sessions où les animaux n'ont plus aucune vibrisse (**figure R6 A**). La quantification de la proportion d'essais totaux durant lesquels la localisation de l'animal se trouve du côté de l'obstacle contre la proportion où il se trouve du côté où l'accès est ouvert, soit au tout début de l'allée soit 5 mm avant l'obstacle, nous permet d'observer que la présence de la rangée C suffit à permettre l'adaptation de la trajectoire avant cette limite de 5mm. La coupe des vibrisses empêche cette adaptation (**figure R6 B**).

Ces résultats permettent de confirmer la nécessité des entrées vibrissales dans cette tâche pour adapter la trajectoire à chaque essai, indépendamment du niveau d'apprentissage des animaux.

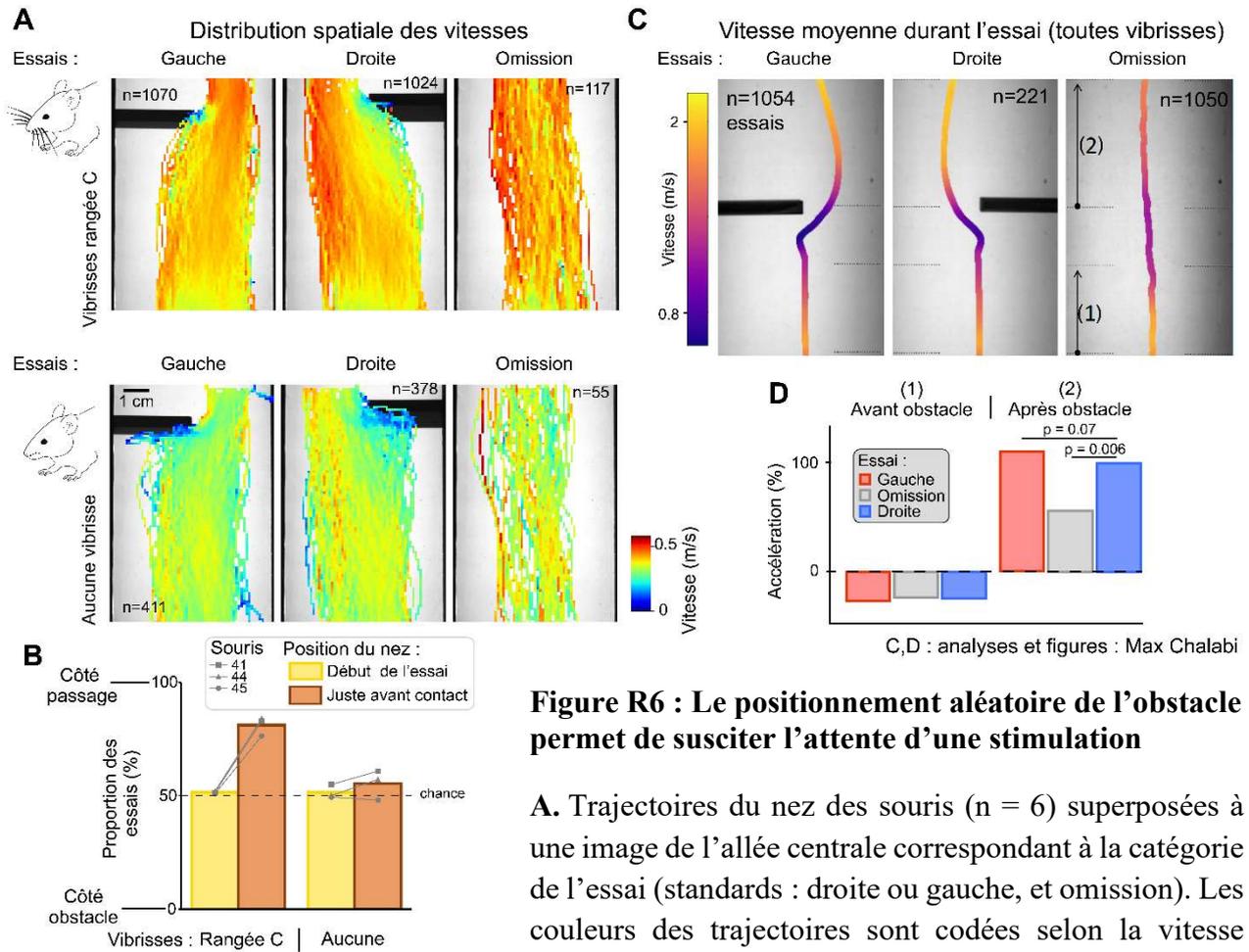


Figure R6 : Le positionnement aléatoire de l'obstacle permet de susciter l'attente d'une stimulation

A. Trajectoires du nez des souris ($n = 6$) superposées à une image de l'allée centrale correspondant à la catégorie de l'essai (standards : droite ou gauche, et omission). Les couleurs des trajectoires sont codées selon la vitesse relative du nez, moyennés spatialement (10×10 pixels).

Les sessions avec les vibrissées de la rangée C intacte sont illustrées en haut, celles réalisées avec la totalité des vibrissées coupées sont illustrées en bas.

B. Proportion de trajectoires se trouvant du côté de l'obstacle ou du côté opposé. Les mesures sont effectuées soit au tout début de l'allée (*jaune*) soit 5 mm avant l'obstacle (*marron*). Trois sessions des 3 mêmes animaux sont comparées avant (*à gauche*), et après coupe des vibrissées (*à droite*). Chaque point correspond à la proportion moyenne des essais pour une souris.

C. Vitesse moyenne (codée en couleur) sur une courbe issue de la position moyenne de toutes les trajectoires des essais correspondants, sur l'axe X. Les deux lignes horizontales reliées par le numéro (1) et les numéro (2) correspondent aux positions auxquelles sont mesurées les vitesses représentées dans le panel D respectivement « avant l'obstacle » et « après l'obstacle ».

D. Variations de vitesse (en %) entre les vitesses des trajectoires au passage de la première ligne horizontale affichée en (1) ou (2), et la seconde ligne horizontale reliée par une flèche.

Lors de session d'un groupe d'animaux supplémentaire, pour lesquels l'intégralité des vibrisses a été conservée sur le museau des animaux, nous avons mesuré une décroissance de la vitesse moyenne au cours de la trajectoire, entre le début de l'allée centrale et 2 cm avant l'obstacle.

Cette mesure est similaire, que l'obstacle soit présenté à gauche, à droite ou omis (**figure R6 C, D – (1)**). Entre la position des animaux une fois l'obstacle à peine dépassé et l'extrémité de l'allée centrale, les animaux accélèrent lorsque l'obstacle est présent à gauche, ou à droite. De manière intéressante, cette accélération est significativement plus faible dans le cas où l'obstacle est omis (**figure R6 C, D – (2)**).

Ceci suggère qu'avoir rendu la position latérale de l'obstacle variable, et modifié ainsi la prédictibilité des entrées sensorielles permet bien, malgré tout, d'induire une forme d'attente sensorielle chez les animaux. Elle se manifeste d'abord par le ralentissement à l'approche de la position de l'obstacle dans les 3 types d'essais, puis par ce retard d'accélération, en l'absence de stimuli indicatifs de la localisation de l'obstacle, durant les essais omission.

Nouvelle observation de larges vagues d'activité liées à un ajustement moteur dans ce contexte de tâche dynamique

Nous avons obtenu et analysé des données neurophysiologiques préliminaires pour cette tâche dynamique chez la souris #63, pour la session finale durant laquelle seule la rangée de vibrisses C était conservée.

De larges vagues d'activité semblables à celles observées pour la souris #25 dans la première tâche statique ont été à nouveau observées tout au long de la session (**Figure R7 A-B**). Les positions spatiales des vagues d'activité et leurs déplacements sont relativement différents de ceux observés chez la souris #25, bien que le décours temporel soit similaire. Comme précédemment, les vagues ont majoritairement tendance à débiter hors du cortex à tonneaux. Elles semblent en revanche provenir de régions le plus souvent postéro-médiales et dans une moindre mesure, postéro-latérales, simultanément ou de manière asynchrone (**figure R7 A-B, essai 33 asynchrone, essai 177 synchrone**). Les activités se propagent ensuite dans la quasi-totalité des cas, vers les aires antérieures à travers vS1, et dans de plus rares cas adoptent la même direction de déplacement sans entrer dans vS1, restant confinées de manière latérale et médiale. Enfin pour de très rares essais, les vagues semblent émerger dans vS1 et se propager radialement, de manière relativement uniforme (**figure R7 A-B, essai 87**).

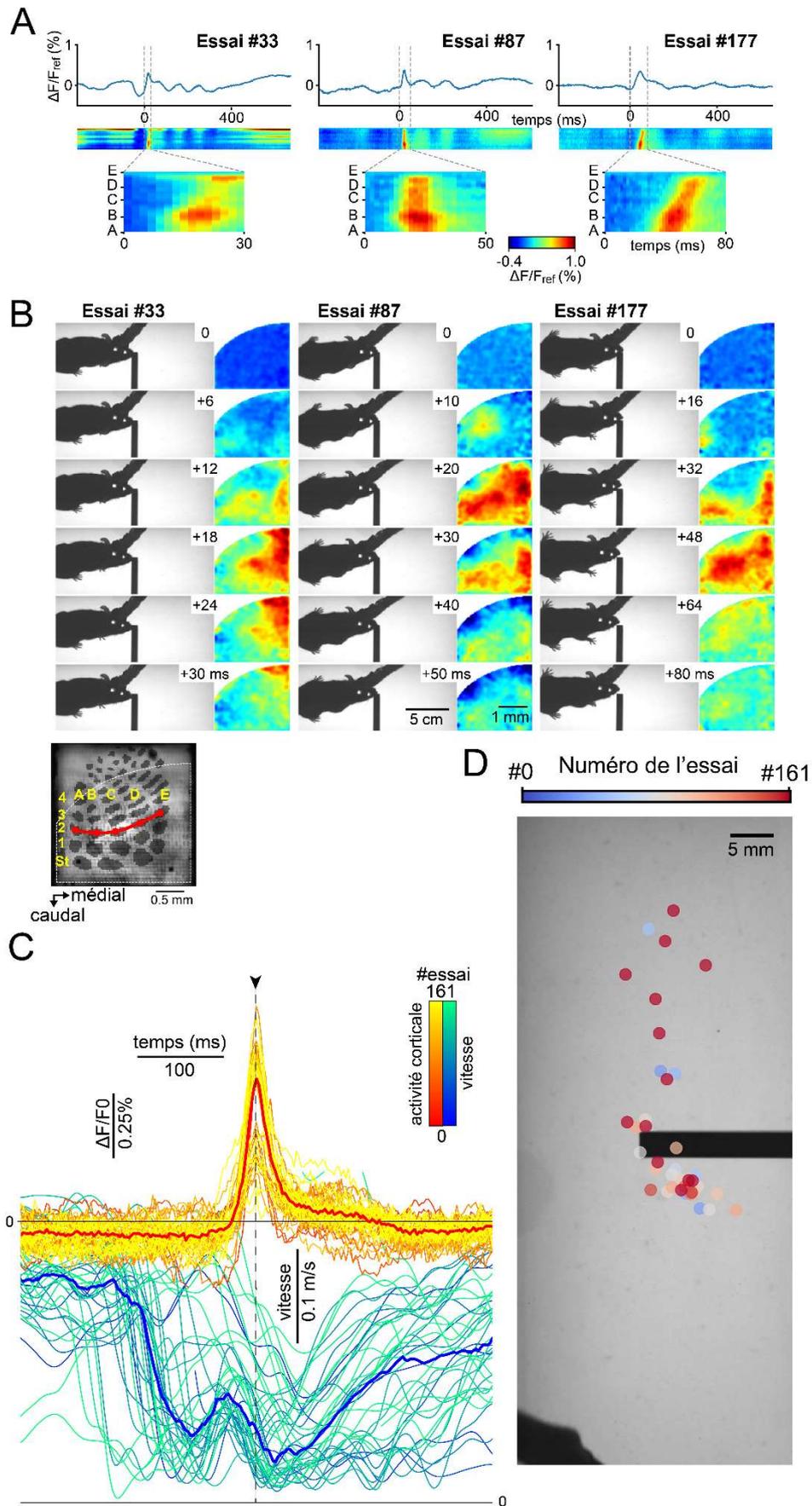


Figure R7 : Vagues d'activité liées à un changement postural et locomoteur

A. En haut : variation de la fluorescence quantifiée à partir de la surface couverte par le cortex à tonneaux. 3 essais sont sélectionnés (une colonne par essai). Au milieu : représentation au cours du temps (axe horizontal) de la distribution spatiale (axe vertical) de la variation de fluorescence (en couleur) dans la section spatiale définie par la courbe passant par les tonneaux A, B, C, D, E de la rangée 2. En bas : zoom sur le motif d'activité étudié. Pour chaque essai, l'image de référence est l'image à 0 ms sur l'axe temporel.

B. Haut : Images du comportement, juxtaposées avec les images synchrones de la variation d'activité corticale par rapport à l'image de référence (première image, en haut de la série de 6). Bas : Image de la fluorescence du colorant sensible au potentiel observée au niveau de vS1 à travers le fibroscope. La localisation des tonneaux associés aux vibrisses obtenue par reconstruction à partir des données histologiques et de la cartographie fonctionnelle est indiquée par des contours zones ombragées. Le contour pointillé gris clair indique le masque excluant les zones non exploitables du champ utilisé pour l'analyse. La ligne rouge indique la région d'intérêt utilisée pour les quantifications espace-temps présentées en B haut.

C. Haut : Variation de fluorescence (moyenne spatiale sur la surface imagée) au cours du temps, pour tous les essais durant lesquels une vague est détectée alors que la position du nez est identifiable (code couleur rouge-jaune). Les traces sont temporellement alignées par rapport à l'apogée de la vague (tête de flèche). Bas : Variation de la vitesse du nez sur l'axe vertical de l'allée centrale. Les codes couleurs des traces (nuances rouge-jaune et bleu-vert) correspondent au numéro de l'essai. (n= 43 essais avec vagues sur 161 essais avec enregistrement des activités corticales)

D. Localisation du nez de l'animal lors des vagues, superposée à une image de l'allée centrale durant l'essai avec l'objet à droite. Les couleurs des points sont codées selon le numéro de l'essai durant la session.

Indépendamment de ces différences, ces vagues sont à nouveau temporellement corrélées à une décélération menant à un bref arrêt, puis une reprise rapide de la locomotion (**figure R7 C**). Un changement postural avec une tendance à l'écartement des pattes postérieures, est également associé à ces vagues, comme décrit pour la souris #25 (**figure R7 B essais #87, #177**). La première décélération observée sur la **figure R7 C** correspond à la conséquence du heurt avec l'obstacle, qui n'a pas systématiquement lieu avant la vague. Les positions du nez durant la survenue des vagues sont en effet localisées en groupe à proximité de l'obstacle lorsqu'il se trouve à droite, mais également une fois que celui-ci a été dépassé (**figure R7 D**). Dans le cas où des heurts ont lieu, on observe un délai d'environ 70 ms entre la décélération liée au heurt, et une seconde décélération accompagnée d'un changement postural (**figure R7 C-D**).

Ces résultats viennent confirmer la reproductibilité de larges activités liées à des changements locomoteurs et posturaux dans le cortex vS1.

L'analyse plus approfondie de ces données neurophysiologiques, y compris en lien avec les contacts vibrissaux contre l'obstacle ou son omission est à l'heure actuelle en cours de réalisation. Un jeu de données pour lequel l'intégralité des vibrisses est conservée durant toutes les phases expérimentales a été produit, améliorant qualitativement la capacité d'adaptation motrice des souris à l'approche de l'obstacle dynamique, et réduisant le nombre de heurts ayant pu être observés durant la session de la souris #63.

Estimation des dynamiques vibrissales sensorielles et motrices

Au cours des analyses présentées, nous n'avons pas utilisé les informations provenant directement du suivi des vibrisses pour identifier le lien temporel entre les activités corticales et les contacts vibrissaux. Nous avons en effet initialement tenté de mettre au point une stratégie expérimentale et analytique permettant de suivre la variation de courbure et d'angle au cours des trajectoires des animaux, mais cette stratégie a montré plusieurs limites :

- Elle ne permet pas d'obtenir avec fiabilité, pour un essai unique, la variation de courbure à l'approche de l'obstacle correspondant au premier contact. Les variations de courbure peuvent être de même amplitude pour le contact et des déflexions engendrées durant le whisking, indépendamment de la localisation de l'animal. Ceci pourrait s'expliquer par le frottement des vibrisses sur le sol de l'allée centrale (**figure R8 A-B essai #176**).
- De larges variations de courbure, répétées d'un essai à l'autre et visibles sur la moyenne des essais, sont observées contre l'obstacle (**figure R8 A- C**). Elles sont cependant mesurées très tardivement, alors que les souris ont déjà eu l'occasion de faire contact avec l'obstacle, et d'adapter leur trajectoire en conséquence. Ces larges variations ne sont donc également pas utilisables pour estimer le moment de la première réception d'informations tactiles relatives à celui-ci.
- La grande proportion de faux négatifs dans le suivi des vibrisses avec cette technique de mesure pouvant être compensée par une interpolation uniquement dans le cas d'un faible nombre de points manquants, entraîne le rejet des données de courbure et d'angle pour une grande proportion des essais (données vibrissales extraites pour 31 sur 100 essais en moyenne sur les sessions traitées).

Malgré ces inconvénients rendant la technique inutilisable pour obtenir le moment et le lieu du premier contact dans les essais individuels, nous pouvons tout de même noter que la courbure moyenne des essais témoigne d'une augmentation à l'approche de l'obstacle, pour les deux animaux présentés ici (**figure R8 C**). Cette variation importante de courbure a lieu à partir d'environ 26.5 mm de celui-ci, de manière consistante avec les données de la littérature concernant la longueur des vibrisses, culminant à 30 mm (Ibrahim and Wright, 1975). C'est donc cette valeur, arrondie à 25 mm qui a été utilisée pour définir l'extrémité de la zone de premier contact potentiel utilisée durant l'analyse des résultats de la tâche d'évitement statique (soit de à +5 mm +25 mm de l'obstacle, voir **figure R4**).

La raison initiale de la coupe des vibrisses à l'exception de la rangée C était de permettre le suivi individuel des vibrisses, et en particulier d'en extraire la variation de courbure au cours du temps à l'aide de la technique présentée ci-dessus.

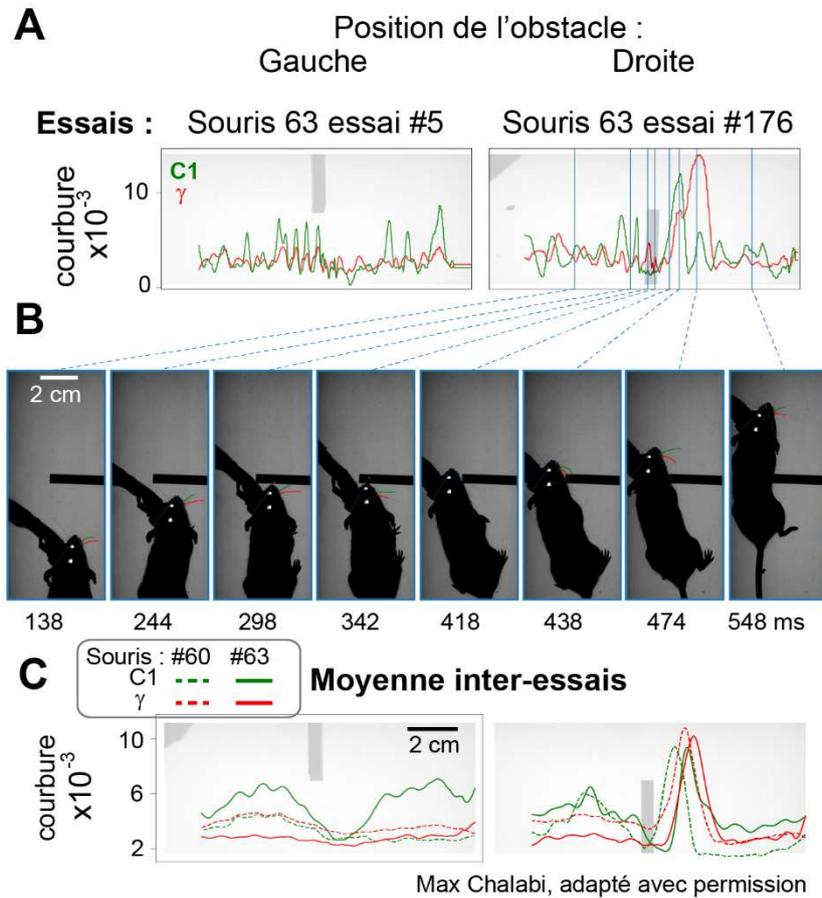


Figure R8 : La technique de mesure de la variation de courbure ne permet pas d'inférer avec fiabilité le moment des premiers contacts vibrissaux à l'échelle de l'essai unique.

A. Quantification de la courbure des vibrisses C1 (vert) et γ (rouge) du museau droit des souris au cours de leur passage dans l'allée (déplacement des animaux de la gauche vers la droite) pour deux essais exemples, pour les deux côtés de présentation de l'obstacle.

B. Images de l'allée centrale et de la souris 63 correspondant aux temps indiqués par des lignes bleues pointillées sur l'essai #176 du panel A. Les vibrisses suivies automatiquement (codées en couleur) sont superposées aux images.

C. Moyennes inter-essais des courbures des vibrisses C1 (vert) et γ (rouge) du museau droit des souris, séparées par type d'essai (l'obstacle à gauche ou à droite - images de fond) Les traits pointillés et pleins représentent respectivement les souris #60 et #63.

Or nous avons observé durant des sessions pilotes avec toutes vibrisses que l'ajustement de la trajectoire permettant d'éviter l'obstacle était amélioré par rapport aux expériences décrites dans ce manuscrit, y compris lorsque les souris étaient attachées par la tête au fibroscope, confirmant que la quantité ou qualité des informations sensorielles était affectée par la coupe partielle des vibrisses.

Ensemble, l'impossibilité d'obtenir les moments de premier contact vibrissal par le suivi de la courbure, ainsi que ces observations relatives à la capacité d'évitement de l'obstacle, nous ont amené à ne plus couper les vibrisses des animaux pour les prochaines séries expérimentales afin d'éviter d'affecter l'acquisition et le traitement de l'information que nous souhaitons étudier. Une seconde stratégie de mesure de l'angle du faisceau de vibrisses a été donc imaginée et mise en place. Le but étant d'obtenir une lecture de l'angle du faisceau de vibrisses entier des animaux. Les variations motrices de cet organe sont communément décrites comme modulées rapidement en fonction des contacts et entrées sensorielles, et pourraient nous permettre ainsi d'inférer de manière indirecte la perception de ces contacts.

A l'échelle d'un essai, cette technique offre une plus grande fiabilité et un faible taux de faux négatifs, permettant de suivre les dynamiques vibrissales plus systématiquement (**figure R9 A**). En moyennant, au cours d'une session entière, les changements de la vitesse angulaire des vibrisses, nous observons une accélération de cette mesure à l'approche des obstacles (**figure R9 B**). Cette altération est présente du côté droit du museau, que l'obstacle se trouve à droite ou à gauche. Cependant, ce changement de vitesse est plus important lorsque l'obstacle est à gauche, traduisant une asymétrie du whisking dépendant du côté du faisceau vibrissal faisant contact. Cette variation de vitesse de mouvement des vibrisses n'a pas lieu lorsque l'obstacle est omis, suggérant qu'elle résulte d'une perception, et non d'une anticipation. Les larges variations négatives et positives du faisceau de vibrisses une fois l'obstacle dépassé correspondent aux « accrochages » puis « décrochages » des vibrisses sur le rebord de l'obstacle droit. L'extraction de cette information motrice permet donc bien d'obtenir des informations relatives aux entrées sensorielles et à la perception tactile à l'approche des obstacles.

Cette nouvelle méthode analytique, ainsi que l'ensemble de la chaîne d'analyse développée au cours de ce projet de recherche sont des outils précieux pour l'exploration des données récoltées grâce aux dispositifs expérimentaux mis au point.

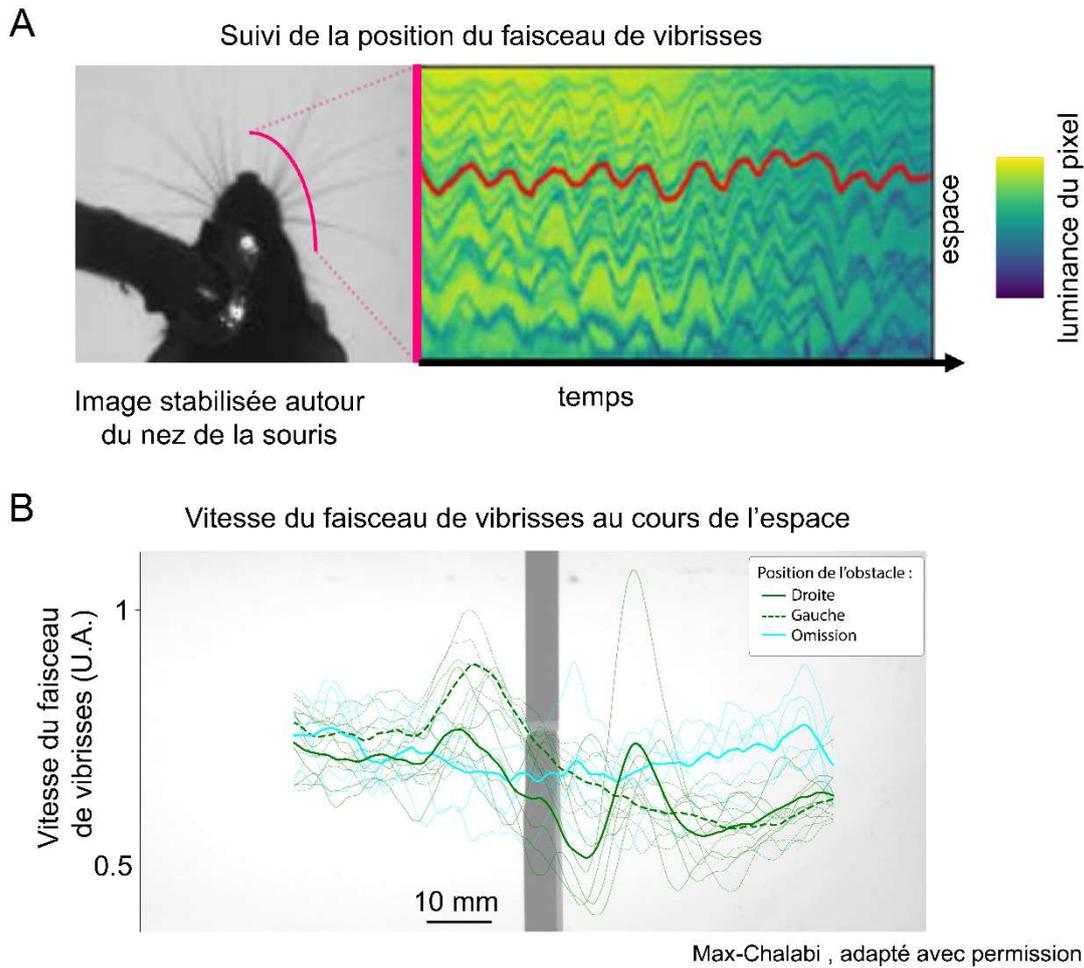


Figure R9 : Méthode d'extraction de la variation angulaire du faisceau de vibrisses résistante aux faux négatifs.

A. Gauche : Image de la tête d'une souris alignée après identification du référentiel défini par l'angle de la tête et le nez de l'animal. La ligne mauve schématise la section de pixels interpolés croisant les vibrisses permettant le calcul de l'angle du faisceau de vibrisses au cours du temps. Droite : Valeurs des pixels (code couleur) au cours du temps (axe horizontal) le long de la ligne croisant le faisceau de vibrisses (vertical). La ligne mauve représente la variation de l'angle du faisceau du côté droit du museau, au cours du temps, après identification de l'ensemble des pics de luminance détectés correspondant aux positions des vibrisses à chaque image.

B. Moyennes inter essai des vitesses de déplacement de l'angle du faisceau de vibrisses du côté droit du museau, au cours de la position sur l'axe Y des animaux dans l'allée centrale. Le fond représente l'image de la position des obstacles, alignés avec les traces des vitesses angulaires sur l'axe Y.

Discussion et conclusions

Paradigme expérimental favorisant la récolte naturelle d'informations sensorielles

Au cours de mon doctorat, j'ai pu mettre en place un cadre expérimental permettant de lier les dynamiques corticales à l'échelle mésoscopique avec le comportement de souris engagées dans une tâche de locomotion.

Cela a impliqué en particulier :

- La mise au point d'un dispositif opto-mécanique rendant compatible l'imagerie fibroscopique des dynamiques spatiotemporelles de l'activité corticale avec la rotation répétée des animaux durant de longues sessions comportementales. Conçu initialement dans le but d'utiliser l'imagerie sensible au potentiel pour suivre les variations de potentiel membranaire à 500 Hz, impliquant l'acquisition de nombreuses séquences courtes d'enregistrement au cours d'une session, il offre divers modes de fonctionnement possibles de manière à pouvoir s'adapter à d'autres méthodes d'imagerie et contraintes expérimentales.
- Le développement d'une enceinte comportementale automatisant la manipulation de l'environnement et la collection de données relatives au comportement animal.
- La conception et la validation d'un procédé expérimental permettant le marquage éveillé du cortex avec une sonde sensible au potentiel chez la souris.
- L'implémentation logicielle de différents scripts d'analyse permettant de mettre en lien de multiples motifs d'activité corticale spécifiques avec le comportement.

Ces outils d'expérimentation scientifique ont été conçus dans leur ensemble pour favoriser les conditions de récolte naturelle d'informations sensorielles par les animaux éveillés. Ils forment ainsi un arsenal précieux pour poursuivre l'étude des bases neuronales du comportement, dont quelques exemples sont décrits ci-dessous, au-delà des thématiques abordées durant cette thèse.

La possibilité de visualiser les mouvements animaux sous différentes perspectives dans l'allée rectiligne transparente en fait, en effet, un bon paradigme pour étudier le contrôle moteur et en particulier la locomotion. Nous avons déjà extrait quelques informations relatives à la

locomotion pour les analyses décrites dans ce document. En ajoutant une seconde caméra rapide latérale, placée à l'opposé du bras hémicirculaire, il est possible d'extraire de bien plus fines informations relatives à la posture, notamment grâce à la démocratisation du suivi sans marqueurs en 3D (Nath *et al.*, 2019). Certains dispositifs expérimentaux ingénieux permettent même le suivi du mouvement des vibrisses avec une illumination en haut contraste comme présenté dans cette thèse, tout en pouvant observer le contact fin des pattes contre le sol. Ils mettent en place cette double mesure grâce à une seconde illumination rasante et une caméra supplémentaire sous la surface de l'allée transparente (Gillespie *et al.*, 2019). Appliquées à cette arène dont le fonctionnement simple permet de motiver la locomotion, ces techniques permettraient d'étudier les voies impliquées dans le contrôle moteur, ou des modèles de maladies impliquant des troubles neurodégénératifs du mouvement.

De plus, grâce à l'automatisation et la possibilité de manipuler l'environnement dynamiquement selon les actions des animaux, les outils mis en place durant ma thèse pourraient également permettre l'étude des mécanismes perceptifs. L'ajout d'un second port de récompense dans l'arène permet aisément le rapport d'une perception par les animaux, dans le cadre d'une discrimination sensorielle. En se basant sur les développements de Kerekes *et al.* (2017), l'arène comportementale avait d'ailleurs initialement été imaginée comme un moyen de rendre reproductible l'exploration tactile d'objets pour l'étude des mécanismes sous-jacents à la discrimination sensorielle dépendante de contacts multivibrissaux.

Enfin, l'incorporation d'une centrale inertielle sur l'implant des souris permettant de récolter et analyser facilement les données relatives à l'orientation de la tête, ouvre des perspectives intéressantes pour l'étude du traitement cortical des informations vestibulaires.

Activité du cortex vS1 durant la locomotion guidée par les vibrisses

Ces outils ont ainsi permis au cours de ma thèse de générer de précieuses données préliminaires concernant les dynamiques spatio-temporelles ayant lieu dans vS1 durant la locomotion guidée par les vibrisses.

Dynamiques d'activité liées à des ajustements moteurs

De manière notable, nous avons observé qu'une part importante de l'activité dans le cortex somatosensoriel primaire, ainsi que des aires corticales adjacentes, est liée à des ajustements d'ordre moteur, en adéquation avec la littérature. En effet, Musall et collaborateurs ont montré récemment qu'une large part de l'activité neuronale mesurée sur toute la surface dorsale du néocortex est liée à de tels traitements. Ils montrent notamment que des activités motrices, sans lien direct avec un comportement requis durant une tâche, comme la flexion de la patte arrière lors d'un léchage pour le report d'une perception, peuvent être temporellement corrélées avec des événements liés à la tâche. Ces mouvements non nécessaires ont en effet tendance, avec l'apprentissage, à devenir stéréotypés et reproductibles durant le comportement. Le traitement cortical en lien avec ceux-ci peut ainsi facilement être mésinterprété comme relatif au traitement cognitif en rapport avec la tâche si les divers mouvements de l'animal ne sont pas surveillés (Musall *et al.*, 2019). Ceci souligne la nécessité cruciale de disposer du suivi d'un nombre raisonnable de paramètres moteurs et posturaux durant l'étude de toute tâche comportementale, y compris n'ayant a priori pas de lien avec le comportement étudié, afin d'être en mesure de discerner des corrélats sensoriels, moteurs, voire sensori-moteurs au sein des dynamiques neuronales.

Nous avons décrit, dans la présentation des résultats, que les vagues que nous observions au niveau de vS1 étaient apparemment liées à des paramètres moteurs, à savoir une soudaine décélération de la course voire un arrêt bref, accompagnée d'un changement postural. Il y a également brièvement été avancé que la cause de cette adaptation motrice pouvait être multifactorielle, et notamment liée à l'inertie du faisceau de fibres dans le cas particulier où les souris avaient reçu une intervention chirurgicale récente. En effet, nous avons réalisé il y a peu une série d'expériences pilotes dans la tâche dynamique chez un groupe d'animaux exprimant le rapporteur calcique GCaMP6 dans les cellules pyramidales du cortex. Lors des différentes sessions expérimentales avec ce groupe d'animaux, disposant de toutes leurs vibrisses, aucun changement postural d'arrêt ni de vagues d'activités équivalentes n'ont été observées durant

l'enregistrement chronique de l'activité calcique. Ainsi, la gestion de la légère inertie du faisceau, ne semblait pas poser de soucis lors de ces sessions.

Or, des changements moteurs et des vagues similaires à celles décrites durant les deux protocoles expérimentaux statiques et dynamiques sont apparues durant une session de ce groupe, réalisée en imagerie sensible au potentiel après retrait de la fenêtre chronique et marquage éveillé, comme décrit précédemment. L'hypothèse que nous formulons alors est qu'un ou plusieurs éléments de la procédure chirurgicale, y compris la fixation du faisceau de fibres optiques directement en pression sur l'os et le néocortex, pourraient affecter le comportement, au niveau sensoriel ou moteur. Ceci semble entraîner des conséquences également sur la capacité d'évitement de l'obstacle par les animaux.

Des investigations supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre l'origine de ces adaptations motrices (brefs arrêts) qui n'ont été observées que lors de sessions d'imagerie sensible au potentiel. Si l'effet se révèle provenir plutôt de la courte anesthésie, nous pourrions tenter d'anesthésier les animaux durant le retrait de la fenêtre et la durectomie avec un couple d'anesthésiants, la kétamine/médétomidine, réversibles à l'aide d'atipamézole qui pourrait améliorer la récupération des animaux. L'effet pourrait se révéler en revanche plutôt lié aux contraintes mécaniques appliquées par le faisceau de fibres optiques (sujet à de multiples forces durant le déplacement) sur le cortex, la dure-mère, ou l'os, pouvant engendrer une gêne pour l'animal. Une solution serait alors de remplacer l'usage d'agarose comme moyen mécanique de prévention des artefacts de mouvement, par la pose d'une nouvelle fenêtre à la suite du marquage éveillé. Le faisceau de fibres ne viendrait ainsi pas en contact direct avec les tissus biologiques, de la même manière que lors des sessions d'imagerie calcique.

Quelles que soient les raisons qui entraînent ces brefs arrêts, ils sont visiblement corrélés à de larges vagues corticales dont l'origine se situe à l'extérieur de vS1. Cette activité pourrait être interprétée comme une forme de copie efférente signalant au cortex sensoriel un brusque changement de programme moteur à prendre en compte pour générer des prédictions en conséquence. Si cette interprétation est très spéculative, ces résultats sont utiles pour prévoir les futures analyses et expérimentations, étant indicatifs sur le type de comportement susceptible d'évoquer une forte activité corticale dans un contexte de locomotion.

Liens potentiels entre l'activité corticale et les contact vibrissaux

Relativement peu d'activations corticales ont semblé présenter un lien potentiel avec les entrées vibrissales durant les contacts précoces au cours des essais standards de la tâche statique. Il a été rapporté dans la littérature que la stimulation d'une vibrisse chez l'animal anesthésié provoquait, avec un délai de quelques millisecondes, une activation au niveau du cortex à tonneau, d'abord localisée au niveau de la colonne correspondante, puis s'étendant rapidement pour couvrir l'intégralité de vS1. L'activité évoquée par une même stimulation chez l'animal éveillé a été révélée comme largement dépendante du contexte comportemental, étant en particulier fortement réduite dans un contexte de « whisking » (Ferezou, Bolea and Petersen, 2006). Aussi, la faible quantité d'activité apparemment évoquée dans vS1 par les stimulations vibrissales pourrait être due au fait que durant ces tâches les animaux « whiskaient » de manière continue sur toute la longueur de l'allée (**figures R8 A et R9 A**). Comme énoncé dans les résultats, les animaux étant experts, il est également possible que la mémorisation de la position des obstacles leur permettant une bonne navigation idiothétique réduise l'importance des contacts vibrissaux et donc leur représentation corticale. C'est la raison pour laquelle nous avons mis en place la tâche dynamique, et les résultats relatifs à ce protocole expérimental sont en cours d'analyse.

Différentes représentations corticales ont été observées entre les déflexions putatives engendrées par un contact précoce, et celles pouvant l'être par une déflexion de plus large accélération, lorsque les vibrisses quittaient l'obstacle. Harrell et collaborateurs, décrivent deux grands types de stimulations mécaniques encodées dans les neurones des couches profondes du cortex somatosensoriel chez le rat. La première dite « stick », correspond à une déflexion légère suite à l'entrée en contact avec un objet, pouvant correspondre ici aux contacts précoces, n'engendrant des changements de courbures que peu visibles (**figure R8 A-B**). La seconde dite « sweep » correspond à une large déflexion rapide, concordant ici potentiellement aux déflexions observées lorsque les vibrisses quittent l'obstacle. Ils rapportent que les champs récepteurs des neurones encodant pour des sweeps sont généralement étendus. En effet ils répondent à la déflexion de vibrisses plus éloignées de leur « vibrisse préférentielle » que les neurones encodant des sticks. Il est bien sûr difficile de relier directement ces résultats à nos observations, cependant elles semblent compatibles avec la plus grande diversité de « tonneaux » impliqués lors des potentiels sweeps que nous avons observés.

Enfin, l'approche analytique utilisée dans mes travaux pour mesurer des activités locales et de faible amplitude a consisté à discrétiser les foyers sur la base de région d'intérêts issues de

critères anatomiques. Cela a permis d'étudier la manière dont leur occurrence était distribuée en fonction de la trajectoire des animaux de manière relativement simple. Cependant, ce processus de discrétisation, qui plus est basé sur des paramètres prédéfinis, pourrait engendrer des faux-négatifs dans la détection de variations d'activité complexes, ne correspondant pas aux paramètres spécifiés. Une part de ces variations apparaissent visiblement sous forme de subtils changements très locaux, parfois même difficilement discernables à l'œil nu sur les données d'imagerie sans réaliser de trace temporelle moyennée sur une région d'intérêt. Il est ainsi souhaitable, lors de la poursuite des analyses, de passer à une méthode corrélative pouvant permettre de lier spatialement ou temporellement de multiples types d'activité avec le comportement à l'échelle d'une session, tout en conservant une variation quantitative à même de rendre compte de dégradés de variations au sein de ces groupes.

Traitement prédictif de l'information dans le cortex

Un des objectifs principaux durant ma thèse était de tenter d'observer les activités corticales dans le cortex vS1 en lien avec le traitement prédictif de l'information sensorielle tactile.

Corrélat comportementaux d'attente

Nous avons mis en évidence dans la tâche statique la tendance des animaux à éviter la localisation de l'obstacle omis, confirmant le fait que les animaux experts sont capables de générer une prédiction quant à la localisation d'obstacles dans l'obscurité. Dans la tâche dynamique, en particulier lorsque l'intégralité des vibrisses étaient intactes, nous avons noté le ralentissement de la vitesse de course des souris avant la position de l'obstacle (qu'il soit présent ou absent), corroborant l'observation précédente. Durant les essais omission de ces sessions, l'accélération du déplacement des souris suite au passage de la position normalement attendue de l'obstacle, plus faible que lorsqu'il était effectivement détecté à gauche ou à droite, pourrait témoigner de l'attente d'une stimulation pouvant confirmer la localisation de cet obstacle dynamique.

Activité corticale en lien avec une forme d'anticipation sensorielle

En observant les activités neurophysiologiques en lien avec le comportement, nous avons avancé l'hypothèse que certaines dépolarisations émergeant dans vS1 avant la zone de premier contact potentiel avec l'obstacle pouvaient être assimilées à l'anticipation d'un contact avec l'obstacle statique.

Ces activités « précoces » survenaient de manière répétable alors que la souris était localisée entre 25 et 35 mm avant l'obstacle, et pour 13,7% des essais totaux ($n = 26/189$ essais). Cette observation est très préliminaire, mais si elle se confirmait, une manière de vérifier l'hypothèse associée, serait de suivre l'évolution des activités corticales dans l'allée rectiligne au cours de l'apprentissage, afin d'observer une éventuelle apparition graduelle d'activités dans cette région. Dans cet objectif, utiliser des rapporteurs génétiquement encodés (sondes calciques ou de potentiel membranaire) serait préférable car cela autoriserait la réalisation de sessions d'imagerie répétées de manière chronique, chez un même animal, et donc d'étudier la mise en place de tels corrélats neuronaux de prédiction au cours de l'apprentissage. Ceci bien sûr à

condition que les résolutions/sensibilité permises par ces sondes autorisent la visualisation de telles dynamiques corticales.

Nous n'avons par ailleurs pas observé d'activité survenant lors de l'omission d'obstacles, à la position où des contacts précoces sont potentiellement élicités durant les essais standards. De telles activités auraient pu témoigner d'une prédiction sensorielle ou d'un signal d'erreur (le signal d'erreur correspondant à l'activité ascendante soustraite de l'activité de prédiction sensorielle d'après le modèle du codage de prédiction). Nous n'observons pas de tel signal ce qui pourrait s'expliquer de plusieurs manières :

- Soit car ce n'est pas un calcul réalisé dans, ou une information projetée vers, le cortex vS1.
- Soit car ce calcul dépend largement du contexte du contact vibrissal attendu, c'est-à-dire de l'importance de ce contact vis-à-vis du comportement de locomotion. L'analyse des résultats de la tâche dynamique devrait permettre de répondre rapidement sur ce point.
- Soit car le nombre de neurones encodant cette erreur de prédiction ou recevant des afférents liés à une prédiction sensorielle est trop faible pour que leur activité soit détectée au niveau de la population.

Dans ce dernier cas, il serait nécessaire de faire usage d'autres méthodes d'acquisition de l'activité neuronale, permettant l'enregistrement de larges assemblées de neurones à l'échelle de la cellule unique. Les solutions optiques satisfaisant ces critères, compatibles avec le comportement se résument pour l'instant à quelques microscopes embarqués permettant l'imagerie cellulaire dans le cortex sur des champs de vision supérieurs à 1 mm (Leman *et al.*, 2021; Zong *et al.*, 2022). Cependant, tous ces systèmes présentent une fréquence d'acquisition très basse, entre 15 et 60 Hz. Si nous souhaitons accéder à un échantillonnage temporel plus élevé, nous pouvons utiliser une série de sondes électrophysiologiques, comme les sondes NeuroPixel, qui représentent un défi dans le cadre d'une tâche comportementale motorisée et en comportement libre, fortement sujette aux artefacts électromagnétiques et mécaniques.

Enfin, il pourrait être intéressant, sachant que le codage prédictif implique plusieurs acteurs, d'élargir les investigations au-delà de vS1, à d'autres aires corticales, notamment le cortex somatosensoriel secondaire, les cortex moteurs primaire et secondaire, le cortex postérieur pariétal, mais également l'hippocampe. Cela pourrait être envisagé à l'avenir par l'utilisation de photométrie multisite (Pedrosa *et al.*, 2022).

Omission et déviance

Nous avons abordé ici la recherche de signatures neuronales corroborant la théorie d'un codage prédictif dans le système sensoriel tactile à travers l'omission d'entrées sensorielles attendues du fait de l'expérience passée, mais aussi des commandes motrices produites par l'animal. Un autre moyen d'aborder cette question du codage prédictif est l'introduction de stimuli déviants par rapport aux attentes sensorielles.

Nous avons initialement tenté d'introduire de telles « surprises » en plus des omissions durant quelques sessions. Ainsi nous avons déplacé le premier obstacle de la tâche comportementale statique de sa position gauche vers la droite de l'allée dans un très faible nombre d'essai. Sa position sur l'axe longitudinal de l'allée restait identique, et l'obstacle à gauche était donc enlevé pour permettre le passage des animaux. La surprise avait été telle que pour plusieurs essais avec le fibroscope, quelques animaux étaient brièvement « tombés » de l'allée centrale, (le fibroscope servant de filet de sécurité) cessant ensuite de s'engager dans la tâche, et suggérant qu'une déviance plus subtile serait de rigueur. Il pourrait cependant être intéressant de revenir vers cette idée d'introduction de stimuli déviants, cette fois en modifiant non la position mais la nature de l'objet présenté (barre d'orientation différente par exemple).

Enfin, la littérature concernant le codage prédictif dans la modalité auditive suggère que la temporalité est un facteur clé pour l'observation de réponses spécifiques à des stimuli déviants ou omis (Heilbron and Chait, 2018). Il est possible que dans la tâche dynamique, implémentée pour rendre essentielle la collecte d'informations tactiles pour la locomotion, la prédiction de la position de l'obstacle était peut être rendue difficile par l'absence d'autres indices sensoriels à proximité immédiate de celui-ci. Il pourrait être envisagé d'ajouter des indices sensoriels au sol ou latéralement, avant le contact avec l'obstacle, pour favoriser la mise à jour des repères de navigation.

Approche causale

Enfin, dans le cas de la mise en évidence de motifs d'activité neuronale pouvant être liés à la prédiction apprise d'une stimulation, une approche causale reste un formidable outil afin d'établir un lien fort sur les conséquences perceptuelles d'une activité. La photo-excitation des interneurons ou la photo-inhibition des cellules excitatrices peuvent ainsi permettre de réprimer une activité ciblée identifiée sur la base d'une localisation ou d'une époque temporelle.

Bibliographie

Adibi, M. (2019) “Whisker-Mediated Touch System in Rodents: From Neuron to Behavior,” *Frontiers in Systems Neuroscience*. Frontiers Media S.A., p. 40. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnsys.2019.00040>.

Ayaz, A. *et al.* (2019) “Layer-specific integration of locomotion and sensory information in mouse barrel cortex,” *Nature Communications*, 10(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10564-8>.

Bosman, C.A. and Aboitiz, F. (2015) “Functional constraints in the evolution of brain circuits,” *Frontiers in Neuroscience*, 9(SEP), p. 303. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00303>.

Brecht, M., Preilowski, B. and Merzenich, M.M. (1997) “Functional architecture of the mystacial vibrissae,” *Behavioural Brain Research*, 84(1–2), pp. 81–97. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)83328-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)83328-1).

Casanova, M.F. and Casanova, E.L. (2019) “The modular organization of the cerebral cortex: Evolutionary significance and possible links to neurodevelopmental conditions,” *Journal of Comparative Neurology*. Wiley-Liss Inc., pp. 1720–1730. Available at: <https://doi.org/10.1002/cne.24554>.

Clack, N.G. *et al.* (2012) “Automated tracking of whiskers in videos of head fixed rodents,” *PLoS Computational Biology*, 8(7). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002591>.

Diamond, M.E. *et al.* (2008) “‘Where’ and ‘what’ in the whisker sensorimotor system,” *Nature Reviews Neuroscience*, 9(8), pp. 601–612. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn2411>.

F. Aboitiz (2009) “Neocortex : Origins.” Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile: Elsevier.

Ferezou, I. *et al.* (2007) “Spatiotemporal Dynamics of Cortical Sensorimotor Integration in Behaving Mice,” *Neuron*, 56(5), pp. 907–923. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.007>.

Ferezou, I., Bolea, S. and Petersen, C.C.H. (2006) “Visualizing the Cortical Representation of Whisker Touch: Voltage-Sensitive Dye Imaging in Freely Moving Mice,” *Neuron*, 50(4), pp. 617–629. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.043>.

Fiser, A. *et al.* (2016) “Experience-dependent spatial expectations in mouse visual cortex,” *Nature Neuroscience*, 19(12), pp. 1658–1664. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.4385>.

Gillespie, D. *et al.* (2019) “Description and validation of the LocoWhisk system: Quantifying rodent exploratory, sensory and motor behaviours,” *Journal of Neuroscience Methods*. Elsevier, p. 108440. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108440>.

Guo, C. *et al.* (2021) “Miniscope-LFOV: A large field of view, single cell resolution, miniature microscope for wired and wire-free imaging of neural dynamics in freely behaving animals,” *bioRxiv*, p. 2021.11.21.469394. Available at: <https://doi.org/10.1101/2021.11.21.469394>.

Haueis, P. (2016) “The life of the cortical column: opening the domain of functional architecture of the cortex (1955–1981),” *History and Philosophy of the Life Sciences*, 38(3), pp. 1–27. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40656-016-0103-4>.

Heilbron, M. and Chait, M. (2018) “Great Expectations: Is there Evidence for Predictive Coding in Auditory Cortex?,” *Neuroscience*. Elsevier Ltd, pp. 54–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.061>.

Heindorf, M., Arber, S. and Keller, G.B. (2018) “Mouse Motor Cortex Coordinates the Behavioral Response to Unpredicted Sensory Feedback,” *Neuron*, 99(5), pp. 1040-1054.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.046>.

Herculano-Houzel, S., Manger, P.R. and Kaas, J.H. (2014) “Brain scaling in mammalian evolution as a consequence of concerted and mosaic changes in numbers of neurons and average neuronal cell size,” *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(AUG), p. 77. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00077>.

Hill, D.N. *et al.* (2008) “Biomechanics of the vibrissa motor plant in rat: Rhythmic whisking consists of triphasic neuromuscular activity,” *Journal of Neuroscience*, 28(13), pp. 3438–3455. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5008-07.2008>.

Hill, D.N. *et al.* (2011) “Primary motor cortex reports efferent control of vibrissa motion on multiple timescales,” *Neuron*, 72(2), pp. 344–356. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.020>.

Hölscher, C. *et al.* (2005) “Rats are able to navigate in virtual environments,” *Journal of Experimental Biology*, 208(3), pp. 561–569. Available at: <https://doi.org/10.1242/jeb.01371>.

Hong, Y.K. *et al.* (2018) “Sensation, movement and learning in the absence of barrel cortex,” *Nature*, 561(7724), pp. 542–546. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0527-y>.

Horton, J.G. and Adams, D.L. (2005) “The cortical column: A structure without a function,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, pp. 837–862. Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1623>.

Hubatz, S. *et al.* (2020) “Spatiotemporal properties of whisker-evoked tactile responses in the mouse secondary somatosensory cortex,” *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57684-6>.

Hubel, D.H. and Wiesel, T.N. (1962) “Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat’s visual cortex,” *The Journal of Physiology*, 160(1), pp. 106–154. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006837>.

Ibrahim, B. and Wright, E.A. (1975) “The growth of rats and mice vibrissae under normal and some abnormal conditions,” 33, pp. 831–844.

Jin, T.E., Witzemann, V. and Brecht, M. (2004) “Fiber Types of the Intrinsic Whisker Muscle and Whisking Behavior,” *Journal of Neuroscience*, 24(13), pp. 3386–3393. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5151-03.2004>.

Keller, G.B., Bonhoeffer, T. and Hübener, M. (2012) “Sensorimotor Mismatch Signals in Primary Visual Cortex of the Behaving Mouse,” *Neuron*, 74(5), pp. 809–815. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.040>.

Keller, G.B. and Mrsic-Flogel, T.D. (2018) “Predictive Processing: A Canonical Cortical Computation,” *Neuron*, 100(2), pp. 424–435. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.003>.

Kerekes, P. *et al.* (2017) “Bilateral Discrimination of Tactile Patterns without Whisking in Freely Running Rats,” *The Journal of Neuroscience*, 37(32), pp. 7567–7579. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0528-17.2017>.

Kleinfeld, D. and Deschênes, M. (2011) “Neuronal basis for object location in the vibrissa scanning sensorimotor system,” *Neuron*, pp. 455–468. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.009>.

Krubitzer, L. and Hunt, D.L. (2007) “Captured in the net of space and time: Understanding cortical field evolution,” in *Evolution of Nervous Systems*. Elsevier Inc., pp. 49–72. Available at: <https://doi.org/10.1016/B0-12-370878-8/00058-6>.

Land, P.W. and Simons, D.J. (1985) “Cytochrome oxidase staining in the rat sml barrel cortex,” *The Journal of Comparative Neurology*, 238(2), pp. 225–235. Available at: <https://doi.org/10.1002/cne.902380209>.

Larriva-Sahd, J.A. (2014) “Some predictions of rafael lorente de no 80 years later,” *Frontiers in Neuroanatomy*. Frontiers Research Foundation. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00147>.

Larsen, D.L.D. and Krubitzer, L. (2008) “Genetic and epigenetic contributions to the cortical phenotype in mammals,” *Brain Research Bulletin*. Elsevier, pp. 391–397. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.041>.

Lebeuf, R. *et al.* (2009) “Straightforward synthesis of the near-Infrared fluorescent voltagesensitive dye RH1691 and analogues thereof,” *Organic Letters*, 11(21), pp. 4822–4825. Available at: <https://doi.org/10.1021/ol901846g>.

Lee, S. *et al.* (2013) “A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex,” *Nature Neuroscience*, 16(11), pp. 1662–1670. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.3544>.

Leinweber, M. *et al.* (2014) “Two-photon calcium imaging in mice navigating a virtual reality environment,” *Journal of Visualized Experiments*, (84), p. e50885. Available at: <https://doi.org/10.3791/50885>.

Leman, D.P. *et al.* (2021) “Large-scale cellular-resolution imaging of neural activity in freely behaving mice,” *bioRxiv*, p. 2021.01.15.426462. Available at: <https://doi.org/10.1101/2021.01.15.426462>.

Lorente de Nó, R. (1949) “Cerebral cortex: Architecture, intracortical connections, motor projections.,” *Physiology of the nervous system*, pp. 288–312.

Luzzati, F. *et al.* (2009) “DCX and PSA-NCAM Expression Identifies a Population of Neurons Preferentially Distributed in Associative Areas of Different Pallial Derivatives and Vertebrate Species,” *Cerebral Cortex*, 19(5), pp. 1028–1041. Available at: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn145>.

Luzzati, F. (2015) “A hypothesis for the evolution of the upper layers of the neocortex through co-option of the olfactory cortex developmental program,” *Frontiers in Neuroscience*, 9(APR), p. 162. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00162>.

Mao, T. *et al.* (2011) “Long-Range Neuronal Circuits Underlying the Interaction between Sensory and Motor Cortex,” *Neuron*, 72(1), pp. 111–123. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.029>.

Markov, N.T. *et al.* (2013) “The role of long-range connections on the specificity of the macaque interareal cortical network,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(13), pp. 5187–5192. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1218972110>.

Mathis, A. *et al.* (2018) “Markerless tracking of user-defined features with deep learning,” pp. 1–14. Available at: <http://arxiv.org/abs/1804.03142>.

Mehring, C. *et al.* (2019) “Augmented manipulation ability in humans with six-fingered hands,” *Nature Communications*, 10(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10306-w>.

Mountcastle, V. (1997) “The columnar organization of the neocortex,” *Brain*, 120(4), pp. 701–722. Available at: <https://doi.org/10.1093/brain/120.4.701>.

Musall, S. *et al.* (2019) “Single-trial neural dynamics are dominated by richly varied movements,” *Nature Neuroscience*, 22(10), pp. 1677–1686. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0502-4>.

Nath, T. *et al.* (2019) “Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors,” *Nature Protocols*, 14(7), pp. 2152–2176. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0176-0>.

Naumann, R.K. *et al.* (2015) “The reptilian brain,” *Current Biology*. Cell Press, pp. R317–R321. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.049>.

Noudoost, B. and Moore, T. (2011) “The role of neuromodulators in selective attention,” *Trends in Cognitive Sciences*, 15(12), p. 585. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TICS.2011.10.006>.

Oligschläger, S. *et al.* (2019) “Gradients of connectivity distance in the cerebral cortex of the macaque monkey,” *Brain Structure and Function*, 224(2), pp. 925–935. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1811-1>.

Parker, P.R.L. *et al.* (2020) “Movement-Related Signals in Sensory Areas: Roles in Natural Behavior,” *Trends in Neurosciences*. Elsevier Ltd, pp. 581–595. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.005>.

Pedrosa, R. *et al.* (2022) “Combining Cortical Voltage Imaging and Hippocampal Electrophysiology for Investigating Global, Multi-Timescale Activity Interactions in the Brain,” *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), p. 6814. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23126814>.

Perronnet, L. *et al.* (2016) “An automated workflow for the anatomo-functional mapping of the barrel cortex,” *Journal of Neuroscience Methods*, 263, pp. 145–154. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.09.008>.

Petreaanu, L. *et al.* (2012) “Activity in motor-sensory projections reveals distributed coding in somatosensation,” *Nature*, 489(7415), pp. 299–303. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature11321>.

Radvansky, B.A. and Dombeck, D.A. (2018) “An olfactory virtual reality system for mice,” *Nature Communications*, 9(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03262-4>.

Sofroniew, N.J. *et al.* (2014) “Natural Whisker-Guided Behavior by Head-Fixed Mice in Tactile Virtual Reality,” *Journal of Neuroscience*, 34(29), pp. 9537–9550. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0712-14.2014>.

Sofroniew, N.J. *et al.* (2015) “Neural coding in barrel cortex during whisker-guided locomotion,” *eLife*, 4(DECEMBER2015). Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.12559>.

Sofroniew, N.J. and Svoboda, K. (2015) “Whisking,” *Current Biology*, 25(4), pp. R137–R140. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.008>.

Speed, A. *et al.* (2020) “Spatial attention enhances network, cellular and subthreshold responses in mouse visual cortex,” *Nature Communications*, 11(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14355-4>.

Sperry, R.W., Miner, N. and Myers, R.E. (1955) “Visual pattern perception following subpial slicing and tantalum wire implantations in the visual cortex,” *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48(1), pp. 50–58. Available at: <https://doi.org/10.1037/h0043456>.

Staiger, J.F. and Petersen, C.C.H. (2021) “Neuronal circuits in barrel cortex for whisker sensory perception,” *Physiological Reviews*, 101(1), pp. 353–415. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2019>.

Voigts, J., Herman, D.H. and Celikel, T. (2015) “Tactile object localization by anticipatory whisker motion,” *Journal of Neurophysiology*, 113(2), pp. 620–632. Available at: <https://doi.org/10.1152/jn.00241.2014>.

Warren, R.A. *et al.* (2021) “A rapid whisker-based decision underlying skilled locomotion in mice,” *eLife*, 10, pp. 1–27. Available at: <https://doi.org/10.7554/ELIFE.63596>.

Woolsey, T.A. and van der Loos, H. (1970) “The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S I) of mouse cerebral cortex: The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units,” *Brain Research*, 17(2), pp. 205–242. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90079-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90079-X).

Zilles, K. (2018) “Brodmann: A pioneer of human brain mapping-His impact on concepts of cortical organization,” *Brain*. Oxford University Press, pp. 3262–3278. Available at: <https://doi.org/10.1093/brain/awy273>.

Zmarz, P. and Keller, G.B. (2016) “Mismatch Receptive Fields in Mouse Visual Cortex,” *Neuron*, 92(4), pp. 766–772. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.057>.

Zong, W. *et al.* (2022) “Large-scale two-photon calcium imaging in freely moving mice,” *Cell*, 185(7), pp. 1240-1256.e30. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.017>.

Zucker, E. and Welker, W.I. (1969) “Coding of somatic sensory input by vibrissae neurons in the rat’s trigeminal ganglion,” *Brain Research*, 12(1), pp. 138–156. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(69\)90061-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(69)90061-4).

Résumés

Résumé grand public :

La prédiction sensorielle est une fonction essentielle du système nerveux qui permet de favoriser l'extraction d'informations saillantes et de réduire le temps de réaction, optimisant ainsi le comportement. Chez les mammifères, le cortex cérébral est supposé jouer un rôle clé dans cette capacité à anticiper les entrées sensorielles futures en fonction du contexte, de l'expérience passée et des actions motrices en cours. La modalité sensorielle tactile est un cadre particulièrement pertinent pour l'étude de ces processus prédictifs car elle implique de fortes interactions sensorimotrices. En utilisant pour modèle le système vibrissal de la souris, animal nocturne, qui se sert de ses longs poils faciaux afin de sonder son environnement proche et se déplacer dans l'obscurité, le travail de doctorat que je présente ici visait à rechercher les corrélats neurophysiologiques de mécanismes prédictifs du traitement de l'information au niveau du cortex somatomatosensoriel primaire.

English general public summary:

Sensory prediction is an essential function of the nervous system that promotes the extraction of salient information and reduces reaction time, thereby optimizing behaviour. In mammals, the cerebral cortex is thought to play a key role in this ability to anticipate future sensory inputs based on context, past experience, and current motor actions. The tactile sensory modality is particularly relevant for the study of these predictive processes because it involves strong sensorimotor interactions. Using as a model the vibrissal system of the mouse, a nocturnal animal, which uses these long facial hairs to probe its immediate environment and navigate in the dark, the research work I present here aimed to investigate the neurophysiological correlates of predictive mechanisms of information processing in the primary somatomatosensory cortex.

Visualizing primary somatosensory cortex of mice's activity in the context of predictive processing of tactile sensory information study.

Abstract:

The mammalian neocortex plays a key role in sensory analysis and the generation of motor commands. Numerous observations support the view that the neocortex is capable of constructing an internal model of the interaction with the environment based on experience, in order to generate sensory expectations according to the context and ongoing motor actions. Such a calculation would involve the generation of error signals in case of divergence between the actual and predicted sensory inputs, which would allow the internal model and motor commands to be adjusted, thereby optimising the behaviour. My doctoral project focuses on the study of the neuronal mechanisms involved in such sensory predictions using the vibrissal tactile system of the mouse as a model.

First, I developed a whisker-guided locomotion task in which mice were confronted with an obstacle while they navigate in a hemi-circular track in the dark. My aim was to analyse the spatio-temporal dynamics of the cortical activity evoked by the contact of the whiskers with this obstacle under two conditions: either when the location of the object was familiar, and therefore predictable; or when it was modified by surprise. By introducing deviations between the expected sensory inputs and those actually received by the animal, we aimed to reveal neural signals related to tactile sensory prediction and prediction errors at the level of the primary somatosensory cortex.

To do so, I adopted a fibroscopic approach allowing the observation, at a resolution of 25 μm , of the entire whiskers representation area within the primary somatosensory cortex (vS1). To prevent twisting of the fiberscope that could restrict animals' movement during the behavioural task, I developed a motorized rotary interface that couples the rotation of the fiberscope to that of the animal. With this novel device, it is possible to record, on a mesoscopic scale, fluorescence changes induced by neuronal membrane potential variations while the animals are freely navigating and collecting tactile information in an ethologically relevant manner. Simultaneous videography of the animals' behaviour allowed us to link the dynamics of cortical activity, sensory inputs, and motor adjustments at the millisecond scale.

Our preliminary results show that there are variations of activity at the neuronal population level in vS1 as animals probe the obstacle with their whiskers. We also observe that a large part of the variation in activity recorded in vS1 is related to motor adjustments. According to the hypothesis of predictive processing of sensory information, this motor information present in the sensory areas may allow anticipating the consequences of movements performed in a specific context on the sensory inputs. However, in a still small number of animals tested, we did not observe mesoscopic dynamics in vS1 that could be related to a prediction error, as the animals passes the (highly predictable) location of unexpectedly removed obstacle.

However, these observations remain preliminary. All the technical and analytical means put in place during my thesis will enable the completion and possible corroboration of these initial results in the near future

Keywords: predictive processing, voltage sensitive dye imaging, freely moving behaviour, whisker guided behaviour, mesoscopic fibroscopy, sensorimotor integration, primary somatosensory cortex

Résumé :

Le néocortex des mammifères joue un rôle clé dans l'analyse sensorielle et la genèse de commandes motrices. De nombreuses observations nous invitent à penser que le néocortex serait capable, à partir de l'expérience vécue, de construire un modèle interne de l'interaction avec l'environnement, de manière à générer des attentes sensorielles en fonction du contexte et des actions motrices en cours. Un tel calcul impliquerait la production de signaux d'erreur en cas de divergence entre les entrées sensorielles réelles et celles prédites, ce qui permettrait d'ajuster le modèle interne ainsi que les commandes motrices, optimisant ainsi le comportement. Mon projet doctoral est centré sur l'étude des mécanismes neuronaux mis en jeu dans de telles prédictions sensorielles en utilisant pour modèle le système tactile vibrissal de la souris.

Tout d'abord, j'ai mis au point une tâche de locomotion guidée par les vibrisses où les souris étaient confrontées à un obstacle alors qu'elles effectuaient un parcours hémicirculaire dans l'obscurité. Mon objectif était d'analyser les dynamiques spatio-temporelles de l'activité corticale évoquée par le contact des vibrisses avec cet obstacle dans deux conditions : soit lorsque la localisation de l'objet était familière, et donc prédictible ; soit lorsque celle-ci était modifiée par surprise. En introduisant ainsi des déviations entre les entrées sensorielles attendues et celles effectivement reçues par l'animal, nous visons à mettre en évidence des signaux neuronaux liés à la prédiction et aux erreurs de prédiction sensorielle au niveau du cortex somato-sensoriel primaire.

Pour ce faire, j'ai adopté une approche fibroscopique permettant l'observation, à une résolution de 25 μm , de la totalité de la zone de représentation des vibrisses au sein du cortex somatosensoriel primaire (vS1). Pour empêcher les torsions du fibroscope susceptibles de restreindre les mouvements des animaux au cours de la tâche de locomotion, j'ai développé une interface rotative motorisée permettant de coupler la rotation du fibroscope à celle de l'animal. Grâce à ce dispositif original, il est possible d'enregistrer, à l'échelle mésoscopique, les changements de fluorescence induits par les variations de potentiel de membrane des neurones pendant que les animaux naviguent librement, et recueillent des informations tactiles d'une manière éthologiquement pertinente. La vidéographie simultanée du comportement des animaux nous a permis de lier les dynamiques de l'activité corticale, les entrées sensorielles et les ajustements moteurs, à l'échelle de la milliseconde.

Nos résultats préliminaires font état de variations d'activité à l'échelle de la population neuronale dans vS1 alors que les animaux sondent l'obstacle avec leurs vibrisses. Nous montrons également qu'une large part de la variation d'activité enregistrée dans le cortex sensoriel primaire est liée à des ajustements moteurs. Selon l'hypothèse d'un traitement prédictif de l'information sensorielle, ces informations motrices présentes dans les aires sensorielles pourraient permettre d'anticiper les conséquences des mouvements réalisés dans un contexte spécifique sur les entrées sensorielles. Cependant, dans un nombre encore réduit d'animaux testés, nous n'avons pas observé de variations de l'activité neuronale à l'échelle de la population dans vS1 pouvant être apparentée à une erreur de prédiction, alors que les animaux approchaient la localisation (fortement prédictible) de cet obstacle retiré par surprise.

Ces observations restent cependant préliminaires. L'ensemble des moyens techniques et analytiques mis en place au cours de ma thèse permettront dans un futur proche de compléter et le cas échéant corroborer ces premiers résultats.

Mots clés : traitement prédictif, imagerie sensible au potentiel, comportement en mouvement libre, comportement guidé par les vibrisses, fibroscopie mésoscopique, intégration sensori-motrice, cortex somato-sensoriel primaire