

Titre: Développement d'outils de vectorisation d'angiographies obtenues par microscopie 2-photons dans le contexte du vieillissement du cerveau
Title:

Auteur: Joël Lefebvre
Author:

Date: 2014

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Lefebvre, J. (2014). Développement d'outils de vectorisation d'angiographies obtenues par microscopie 2-photons dans le contexte du vieillissement du cerveau [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/1515/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1515/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Frédéric Lesage
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'OUTILS DE VECTORISATION D'ANGIOGRAPHIES
OBTENUES PAR MICROSCOPIE 2-PHOTONS DANS LE CONTEXTE DU
VIEILLISSEMENT DU CERVEAU

JOËL LEFEBVRE

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

DÉVELOPPEMENT D'OUTILS DE VECTORISATION D'ANGIOGRAPHIES
OBTENUES PAR MICROSCOPIE 2-PHOTONS DANS LE CONTEXTE DU
VIEILLISSEMENT DU CERVEAU

présenté par : LEFEBVRE Joël

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. COHEN-ADAD Julien, Ph.D., président

M. LESAGE Frédéric, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. COMTOIS Philippe, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Michèle Desjardins et Romain Berti pour l'acquisition des mesures à l'aide du microscope à fluorescence 2-photons; Imanne El Maachi et Parikishat Sirpal pour leur aide avec la vectorisation et le nettoyage des réseaux vasculaires; Louis Gagnon et Samuel Bélanger pour leurs conseils et leurs supports tout au long de mon projet. J'aimerais aussi remercier David Boas, Sava Sakadzic et mon superviseur Frédéric Lesage pour leurs supports et leurs conseils. Merci aussi aux membres du laboratoire LIOM à Montréal et du laboratoire du Martinos Center for Biomedical Imaging. Finalement, je tiens à souligner le support de mes amis, de ma famille et de mes parents qui donnent sens à mes projets.

Merci.

RÉSUMÉ

Les pathologies affectant les petits vaisseaux de la neurovasculature sont-elles à l'origine des effets cognitifs qui apparaissent au cours du vieillissement? Pour répondre à cette question, il faut d'abord posséder des outils permettant d'extraire la microvasculature du néocortex à partir d'angiographies acquises par microscopie à fluorescence deux-photons. Une meilleure compréhension de l'évolution de la microvasculature du cerveau avec l'âge et de l'effet de ces modifications sur les fonctions des aires corticales constitue en effet une étape essentielle vers la mise en place de nouveaux biomarqueurs du vieillissement du cerveau. Des modèles réalistes de la vasculature du cerveau peuvent servir de base à des modélisations du débit sanguin et à la simulation de signal IRM. En utilisant des vasculatures vectorisées, de nouvelles voies de recherche pourront donc être explorées, dont l'effet de différents types de pathologies des petits vaisseaux sur le signal IRM dépendant du niveau d'oxygène sanguin (BOLD). L'objectif de ce projet de recherche est donc le développement d'une méthode de segmentation des vaisseaux sanguins et d'un outil d'interaction permettant de corriger et de modifier le réseau vasculaire extrait. Ces outils sont utilisés pour comparer la microvasculature du néocortex de rats provenant de deux cohortes d'âges différents formés de 12 jeunes rats (âge = 11-15 semaines) et 12 rats âgés (âge = 23-25 mois) de type Long-Evans. Ces méthodes ont été développées en utilisant principalement la plateforme de programmation MATLAB, le module de gestion de pipeline de traitement PSOM et l'outil de traitement d'image FIJI. La méthode est semi-automatique, nécessitant une correction manuelle des graphes extraits des angiographies après la segmentation. L'approche modulable adoptée permet l'ajout de nouvelles fonctions et de nouveaux outils, ce qui pourra améliorer sa robustesse et l'automatisation de l'extraction des vaisseaux sanguins. En analysant les masques des vasculatures issus du prétraitement des données, il a été montré que la densité des capillaires dans le néocortex sensorimoteur de rats *Long-Evans* diminue avec l'âge, passant de $\rho = 6.8 \pm 0.3$ [%] pour les jeunes rats à $\rho = 5.4 \pm 0.3$ [%] pour les rats âgés, ce qui représente une baisse statistiquement significative de 20 %. Une analyse utilisant les graphes nettoyés semble également aller dans ce sens en montrant que la densité linéaire des vaisseaux décroît au cours du vieillissement. Cette mesure est liée aux capacités de perfusion de la vasculature, et pourrait indiquer que l'efficacité d'apport en nutriment et en oxygène décroît dans le néocortex sensorimoteur de rats au cours du vieillissement.

ABSTRACT

Are the conditions affecting the small vessels of the neurovasculature the cause of cognitive impairments that appear with aging? To answer this question, we must have tools to extract the neocortex microvasculature from angiograms acquired by two-photon fluorescence microscopy. A better understanding of the brain microvasculature evolution with age and the effect of those changes on the cortical areas functions is indeed an essential step towards the development of new biomarkers of brain aging. Realistic models of the brain vasculature can be used as a basis of blood flow modeling and to simulate MRI signal originating from these vessels. Using vectorized vasculatures, new research avenues can be explored, including the effect of different types of small vessels diseases on blood oxygen level-dependent (BOLD) MRI signal. The main objective of this research project is the development of a blood vessel segmentation method and of an interface to correct and modify the extracted vascular networks. These tools are used to compare the neocortex microvasculature of rats from two different age cohorts. These cohorts consist of 12 young (age = 11-15 weeks) and 12 old Long-Evans rats (age = 23-25 months). The tools have been developed using the MATLAB programming platform, the pipeline processing module PSOM and the image processing tool FIJI. The method is semi-automatic, requiring manual correction of the extracted angiogram graphs after segmentation. The modular approach allows the addition of new features and tools, which can improve the robustness and automation of the blood vessels extraction technique. By analyzing the vasculature masks obtained by the initial data preprocessing, it is found that the density of capillaries in the sensorimotor neocortex of Long-Evans rats decreases with age, from $\rho = 6.8 \pm 0.3$ [%] in young rats to $\rho = 5.4 \pm 0.3$ [%] in aged rats, which represents a statistically significant decrease of 20%. An analysis using the cleaned graphs also seems to go in this direction by showing that the linear density of vessels decreases with aging. This density is linked to the perfusion capacity of the vasculature, and may indicate that the efficiency of nutrient and oxygen distribution decreases with aging in rat's sensorimotor neocortex.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	X
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Description de la problématique	1
1.1.1 Évolution du réseau vasculaire avec l'âge	2
1.1.2 Microvasculature et représentation mathématique.....	3
1.2 Objectifs de recherche	5
1.3 Plan du mémoire.....	7
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	8
2.1 Effets du vieillissement sur la microvasculature du cerveau	8
2.1.1 Vieillissement du cerveau	9
2.1.2 Modification de la dynamique neurovasculaire	11
2.1.3 Modification de la topologie du réseau vasculaire.....	13
2.2 Techniques d'imagerie du cerveau.....	15
2.2.1 Modalités utilisées en clinique	15
2.2.2 Modalités optiques	18
2.2.3 Microscopie par fluorescence 2-photons.....	22
2.3 Segmentation des vaisseaux sanguins	27

2.3.1	Prétraitement des angiographies.....	27
2.3.2	Méthodes d'extraction des vaisseaux sanguins	31
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE		35
3.1	Acquisition des données.....	35
3.1.1	Préparation des animaux	35
3.1.2	Montage du microscope 2-photons	37
3.2	Prétraitement des données	38
3.2.1	Description de la méthode de segmentation.....	39
3.3	Correction manuelle des réseaux vasculaires.....	48
3.3.1	Types d'erreurs de segmentation.....	48
3.3.2	Description de l'interface de correction manuelle	53
CHAPITRE 4 RÉSULTATS		60
4.1	Résultats de segmentation	60
4.2	Résultats de vectorisation.....	61
4.2.1	Caractéristiques des angiographies	61
4.2.2	Effet du nettoyage des angiographies.....	64
4.2.3	Comparaison des VANs entre les groupes d'âge	68
CHAPITRE 5 DISCUSSION		70
5.1	Performance de la méthode d'extraction du VAN	70
5.2	Performance de l'outil de correction manuelle	73
5.3	Discussion sur les résultats et leur signification.....	76
CONCLUSION		79
BIBLIOGRAPHIE		81
ANNEXE A.....		91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1 Métriques liées aux vaisseaux sanguins, aux points d'embranchement et au réseau calculés à partir des graphes (nettoyés ou non).....	65
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Exemple de microvasculature du néocortex (MI63).....	4
Figure 3.1 Schéma du microscope à fluorescence 2-photons	37
Figure 3.2 Diagramme du pipeline de prétraitement des angiographies	40
Figure 3.3 Effet de l'algorithme « Rolling Ball » sur l'histogramme	41
Figure 3.4 : Représentation détaillée de chaque étape de la méthode de segmentation.....	43
Figure 3.5 Représentation schématique de la transformation du squelette en graphe.	46
Figure 3.6 Représentation 2D de la reconstruction du réseau vasculaire à partir du graphe.	47
Figure 3.7 Exemples d'erreurs de segmentation et leur correction à l'aide du GUI	49
Figure 3.8 Effet de la texture de la paroi vasculaire sur le squelette.....	51
Figure 3.9 Exemple de vue 3D de la surface des vaisseaux sanguins.....	55
Figure 3.10 Capture d'écran de l'interface <i>GraphCorrectionGUI</i>	57
Figure 4.1 Exemple des étapes du calcul de densité à partir du masque de la vasculature.....	60
Figure 4.2 Rendu volumétrique d'une angiographie du néocortex (MI63).	62
Figure 4.3 Projections de l'intensité maximale codée en couleur pour les squelettes des angiographies des jeunes rats.	64
Figure 4.4 Distribution des angles (aigus) entre des vaisseaux connectés.....	66
Figure 4.5 Méthode utilisée pour calculer la carte des distances d'adjacence à un vaisseau	67
Figure 4.6 Distribution de la distance d'adjacence à un vaisseau sanguin des tissus.....	68
Figure A.1 Projections de l'intensité maximale codée en couleur pour les squelettes des angiographies des rats âgés	91

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

BOLD	Dépendant du niveau d'oxygène sanguin (<i>Blood Oxygen Level Dependant</i>)
CBF	Débit sanguin cérébral (<i>Cerebral Blood Flow</i>)
CBV	Volume sanguin cérébral (<i>Cerebral Blood Volume</i>)
CMR _{glc}	Métabolisme cérébral du glucose
CMRO ₂	Métabolisme cérébral de l'oxygène
GCG	GraphCorrectionGUI
IRM	Imagerie par résonance magnétique nucléaire
MIP	Projection des intensités maximales (<i>Maximal Intensity Projection</i>)
OEF	Fraction d'extraction d'oxygène (<i>Oxygen Extraction Fraction</i>)
PSF	Fonction d'étalement du point (<i>Point Spread Function</i>)
ROI	Région d'intérêt (<i>Region of Interest</i>)
TEP	Tomographie par émission de positron
SNR	Ratio signal sur bruit (<i>Signal to Noise Ratio</i>)
SVD	Pathologie des petits vaisseaux (<i>Small Vessel Diseases</i>)
VAN	Vascular Anatomical Network
Voxel	Élément de volume (<i>Volume Element</i>)

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La population du Québec fait face au même défi que toutes autres sociétés de l'après-guerre, soit le vieillissement de la population. De nombreux facteurs ont causé ce déséquilibre démographique; entre autres la vague de natalité qui a été ressentie durant les années 50 et 60, communément appelée le « *baby-boom* », le faible taux de procréation des nouvelles générations et l'amélioration des soins de santé menant à une plus longue espérance de vie (Rheault, 2010). En plus des défis économiques et politiques, ce phénomène provoque de nouvelles préoccupations au point de vue de la santé, que ce soit au niveau institutionnel avec l'introduction des soins à domiciles et des services d'accompagnements en fin de vie, ou en ce qui concerne la santé publique avec la promotion de saines habitudes de vie et d'un nouvel aménagement urbain adapté aux besoins de ces populations vieillissantes. Du point de vue scientifique, on peut penser à l'étude des mécanismes impliqués dans le vieillissement, ou bien à l'amélioration des outils diagnostiques et thérapeutiques pour les différentes pathologies qui apparaissent avec l'âge. En particulier, les processus impliqués dans l'apparition des neuropathologies, le rôle que joue le système cardiovasculaire dans ce contexte et l'effet des pathologies affectant la microvasculature du cerveau sur le développement des maladies neurologiques telles que l'Alzheimer, la démence ou le Parkinson, sont des phénomènes fondamentaux qu'il faut mieux comprendre afin d'améliorer l'offre de traitement et de diagnostic. L'objectif de ce travail est de développer des outils permettant d'étudier la structure de la microvasculature du cerveau. Ces outils serviront à obtenir une meilleure compréhension des pathologies affectant le système neurovasculaire à l'échelle microscopique. Ils permettront de mieux comprendre le lien entre ces caractéristiques microscopiques du réseau vasculaire et les symptômes qu'il est possible de mesurer à l'échelle macroscopique avec les méthodes d'imagerie clinique.

1.1 Description de la problématique

Quelques notions doivent être introduites afin de bien comprendre les objectifs de ce projet de recherche. Il y a d'abord un contexte biomédical qui est à la source de cette étude, soit l'évolution du réseau vasculaire du cerveau avec l'âge à l'échelle micrométrique et son rôle dans l'apparition des effets neurologiques du vieillissement. Ensuite, les particularités de la méthode d'imagerie qui a été utilisée pour acquérir des angiographies de la microvasculature à la surface

du cerveau de rats sont présentées. Il ne s'agit ici que d'une brève introduction. Chacun de ces concepts est présenté plus en détail dans le prochain chapitre à l'aide d'une revue de littérature guidée.

1.1.1 Évolution du réseau vasculaire avec l'âge

L'architecture vasculaire du cerveau est un élément central en neurophysiologie puisque c'est la source de nutriments et d'oxygène permettant d'alimenter les tissus neuronaux. Un bon fonctionnement du réseau de vaisseaux sanguins et du couplage entre le système vasculaire, les cellules gliales et les neurones est donc essentiel pour maintenir les fonctions cognitives. Le réseau vasculaire doit par exemple être en mesure d'adapter rapidement la distribution de son débit sanguin pour augmenter sélectivement la perfusion des aires cérébrales actives. On comprend donc que toutes pathologies affectant la structure ou le comportement de la neurovasculature pourraient avoir des impacts notables sur le fonctionnement du cerveau.

Le vieillissement normal du cerveau s'accompagne d'effets cognitifs, par exemple un affaiblissement de l'attention ou de la mémoire de travail. Également, certaines neuropathologies développées avec l'âge tel que la maladie d'Alzheimer sont accompagnées de détérioration de la neurovasculature (Riddle, 2007). Quel est le rôle du système cardiovasculaire, s'il y en a un, dans l'apparition de ces maladies? Les pathologies affectant la microvasculature sont-elles à l'origine des modifications de fonctions neuronales avec l'âge? Sont-elles un facteur y contribuant ou bien est-ce qu'elles sont une conséquence de l'apparition de ces altérations cognitives? Comme il sera mentionné dans la revue de littérature, les mécanismes neurophysiologiques à l'origine du vieillissement sain et pathologique du cerveau ne sont pas encore bien compris. L'étude du rôle de la microvasculature dans ce contexte est donc essentielle pour améliorer la compréhension du système complexe qu'est la neurophysiologie et le couplage neurovasculaire.

Au sein du laboratoire LIOM¹, plusieurs modalités d'imagerie optique de pointe ont été utilisées pour étudier l'effet du vieillissement sur la dynamique vasculaire du néocortex chez les rats. Ces mesures réalisées à la surface du cerveau et atteignant une profondeur de près d'un

¹ Laboratoire d'imagerie optique et moléculaire, dirigé par le professeur Frédéric Lesage.

demi-millimètre ont entre autres permis de montrer que la vitesse des globules rouges et le débit sanguin dans les capillaires augmentent avec l'âge (Desjardins, Berti, Lefebvre, Dubeau, & Lesage, 2014). Ce résultat est contre-intuitif puisque plusieurs études réalisées autant chez l'humain que chez des modèles animaux affirment que le débit sanguin cérébral de base (CBF) diminue au cours du vieillissement (Aanerud et al., 2012; Ances et al., 2009; Bentourkia et al., 2000). Il est donc essentiel de comprendre pourquoi l'étude réalisée dans ce laboratoire a fourni des résultats opposés à ce qui était attendu étant donné les travaux précédents publiés dans la communauté scientifique. La réponse pourrait résider dans la structure même de la vasculature. Pour ce faire, une angiographie tridimensionnelle des aires du néocortex étudiées a été acquise pour chaque rat durant les expériences mentionnées plus haut. Ces volumes ont été mesurés par microscopie à fluorescence 2-photons. Ce projet de maîtrise avait pour but de développer une technique d'extraction du réseau vasculaire contenu dans ces angiographies afin de comparer la microvasculature des jeunes rats avec celle des rats âgés.

1.1.2 Microvasculature et représentation mathématique

En microscopie par fluorescence 2-photons, il est possible de mesurer la géométrie du réseau vasculaire à la surface du cerveau à l'échelle micrométrique de la façon suivante. À l'aide d'une injection intravasculaire d'un agent de contraste qui augmente l'effet 2-photons, le contraste des vaisseaux sanguins est rehaussé. En effectuant un balayage 3D du microscope, il est alors possible de mesurer un angiogramme tridimensionnel du tissu à l'étude. Les angiographies obtenues ont typiquement une taille de 800x800 microns en X - Y , peuvent atteindre une profondeur d'environ 500 microns en Z et possèdent une résolution micrométrique. La résolution de ce type de microscope est de l'ordre du micron. Cet angiogramme est en fait un volume constitué de voxels de dimension anisotrope et dont l'intensité est corrélée à la présence de vaisseaux sanguins.

La microvasculature est constituée d'artérioles de diamètre $d \approx 40 \mu m$, d'un réseau de capillaires ($d \approx 8 - 10 \mu m$) et de veinules ($d \approx 50 \mu m$). Les artérioles forment un réseau planaire de vaisseaux sanguins à la surface du néocortex (Blinder & Shih, 2010). Elles plongent ensuite vers l'intérieur du cerveau pour apporter des nutriments et de l'oxygène aux tissus neuronaux. Ces artérioles se ramifient en de plus petits vaisseaux jusqu'à rejoindre un maillage

interconnecté de capillaires qui ratissent les tissus. Des échanges gazeux et de nutriments s'effectuent au niveau des capillaires et des artérioles (Sakadzic et al., 2014) afin de fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement des neurones. Les capillaires convergent ensuite vers les veinules qui retournent le sang désoxygéné vers le système cardiovasculaire (Figure 1.1).

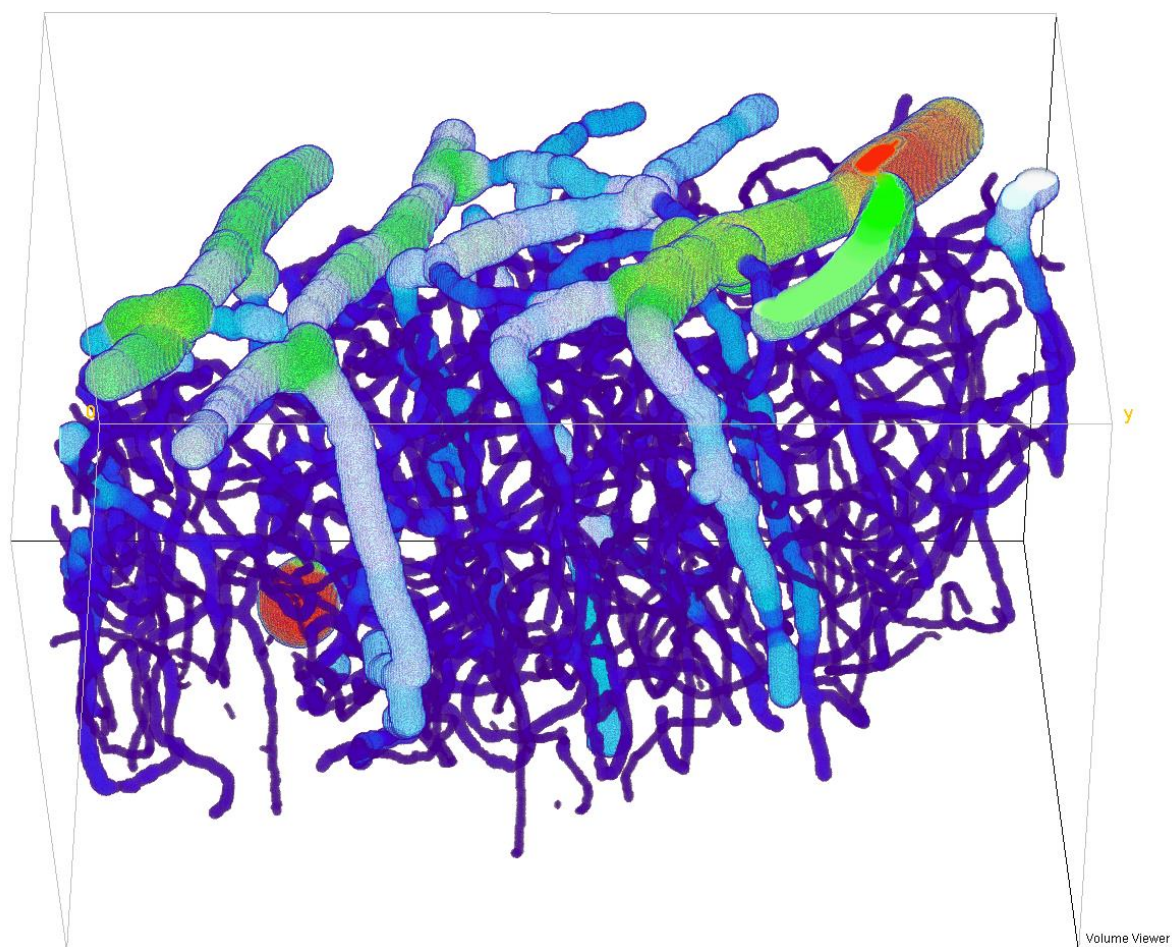


Figure 1.1 Exemple de microvasculature du néocortex (MI63). Dans cette image reconstruite, la couleur est corrélée au diamètre des vaisseaux.

Cette architecture peut se représenter sous la forme d'un graphe. Un graphe est un modèle mathématique permettant de représenter le réseau vasculaire. Il est formé de nœuds et de liens entre ces nœuds. Dans ce modèle, les liens sont les vaisseaux sanguins et les nœuds sont les intersections entre ceux-ci. Il est possible d'assigner des propriétés aux nœuds et aux liens, telles qu'un diamètre, une longueur, une compliance, une pression sanguine, une saturation d'oxygène ou encore une catégorie de vaisseaux. Ce modèle simple peut ensuite servir à modéliser le débit sanguin dans la microvasculature, ou à comparer la structure du réseau entre des individus, ou

encore suivre son évolution dans le temps. Ces deux approches sont respectivement la dynamique vasculaire et la topologie vasculaire. Il est aussi possible de raffiner le modèle en assignant une position 3D aux nœuds et en associant chaque lien à une courbe 4D dans l'espace (position XYZ et diamètre) communément appelée ligne médiale. Ce modèle augmenté du réseau vasculaire anatomique permet de reconstruire la microvasculature en 3D. Il peut alors servir dans des simulations plus poussées du couplage neurovasculaire et de perfusion, et peut même être utilisé comme univers de simulation pour modéliser le signal IRM BOLD à l'échelle micrométrique. En utilisant cette représentation, il est possible d'étudier des problèmes jusqu'alors inaccessibles comme l'effet des modifications de la microvasculature sur le signal IRM de l'activité cérébrale, ou bien l'impact des caractéristiques de la microvasculature sur un modèle mésoscopique du débit sanguin et de la perfusion dans le cerveau. La première étape vers l'étude de la microvasculature du cerveau est bien entendu la mise en place d'une méthode robuste et fiable permettant de mesurer celle-ci et d'extraire sa représentation en graphe avec la plus grande fidélité possible.

1.2 Objectifs de recherche

L'objectif principal du projet de recherche est donc le développement d'outils de segmentation et de vectorisation des angiographies acquises par microscopie à fluorescence 2-photons. Cet outil doit permettre d'extraire la représentation en graphe du réseau microvasculaire du néocortex de rats. En plus de mettre en place des outils de prétraitement des angiographies, une interface de correction manuelle des graphes du réseau vasculaire anatomique doit être développée. Cette interface doit permettre de visualiser le graphe dans son contexte biologique, de repérer les branches erronées, de les effacer, d'ajouter des nœuds et des segments pour combler les trous dans la vasculature et finalement elle doit permettre de visualiser et d'ajuster les propriétés des vaisseaux (telles que le diamètre, la position, le type, etc.). Un dernier but de ce projet de maîtrise est d'utiliser les outils développés pour extraire la vasculature du néocortex de jeunes et de vieux rats. Les graphes acquis de cette façon sont ensuite utilisés pour observer les modifications de la structure et de la topologie de la microvasculature au cours du vieillissement. Pour résumer, ce projet de maîtrise est majoritairement consacré à la conception d'une méthode d'extraction des vaisseaux sanguins, et ces outils sont par la suite utilisés dans une étude de la morphologie microvasculaire dans le contexte du vieillissement.

Les principales hypothèses soutenant l'aspect biomédical de ce projet sont : (1) les modifications de la dynamique vasculaire observées dans les capillaires à la surface du cerveau de rats sont causées par des modifications de la structure du réseau vasculaire; (2) les modifications de structures du réseau vasculaire se manifestent dans la même aire corticale que les modifications hémodynamiques observées, soit le néocortex sensorimoteur; (3) la zone observée est représentative du vieillissement normal du néocortex chez le rat. Du point de vue technique, il est supposé que l'intensité des voxels au sein de l'angiographie est principalement corrélée à la présence de vaisseaux sanguins, c'est-à-dire qu'il est possible de distinguer le signal provenant des vaisseaux de celui provenant du bruit ou des autres tissus biologiques. L'originalité de ce projet réside dans le fait que les mesures de la morphologie de la microvasculature sont faites sur des réseaux vasculaires acquis *in vivo* et que les variations hémodynamiques ont été observées dans ces mêmes graphes.

Mes contributions à ce projet sont (1) le développement d'une méthode de segmentation automatique des angiographies, (2) le développement d'une interface graphique permettant de modifier manuellement le graphe dans son contexte biologique, (3) le nettoyage manuel des graphes extraits des angiographies², (4) la comparaison des métriques de morphologie des réseaux vasculaires entre les deux cohortes de rats. La préparation chirurgicale des animaux, les mesures expérimentales à l'aide du microscope 2-photons et les mesures de dynamique vasculaire (hématocrite, débit sanguin, etc.) ont été réalisées par deux étudiants du laboratoire, soit Michèle Desjardins et Romain Berti. Les outils de segmentation et de vectorisation développés au cours de ce projet de maîtrise sont utilisés au sein du laboratoire LIOM à l'École Polytechnique de Montréal et du laboratoire de David Boas au *Martinos Center for Biomedical Imaging* à Boston, au sein duquel j'ai réalisé un stage de 4 mois au courant de ma maîtrise. Un article scientifique *premier-auteur* basé sur la comparaison de la morphologie de la microvasculature entre les cohortes de rats est en cours de rédaction et sera soumis au comité de révision de la revue choisie à la fin du mois d'août. Plusieurs collaborations ont eu lieu durant

² Cette étape étant très longue, p. ex. de quelques jours à 2 semaines à temps plein selon la qualité de la segmentation et des angiographies, deux stagiaires au sein du LIOM ont contribué au nettoyage des graphes, soient Imanne El Maachi (Session d'été 2013) et Parikshat Sirpal (Session d'été 2014).

mes travaux de recherche : L'étude de (Baraghis et al., 2011) au cours de laquelle j'ai mis en place le modèle de simulation du débit sanguin dans un VAN; deux articles ont été soumis par Louis Gagnon et Sava Sakadzic du *Martinos Center for Biomedical Imaging* à Boston et pour lesquels les outils développés durant ce projet ont été utilisés pour obtenir le réseau vasculaire des angiographies; et (Desjardins et al., 2014), une étude réalisée au sein du laboratoire LIOM et s'intéressant aux modifications de la dynamique vasculaire avec l'âge.

1.3 Plan du mémoire

Ce mémoire est divisé en 4 parties. La première est une revue de littérature guidée portant sur le vieillissement du cerveau et de sa microvasculature, sur les modalités d'imagerie utilisées dans ce contexte et sur les techniques de traitement d'images, ainsi que les méthodes d'extractions des réseaux vasculaires. Les principes de fonctionnement de la microscopie à fluorescence 2-photons sont présentés plus en détail puisque c'est la modalité d'imagerie utilisée dans ce projet. Cet aperçu de quelques travaux publiés par la communauté scientifique permet de mieux comprendre les approches méthodologiques présentées dans la section suivante et qui représentent le cœur de ce projet de recherche. Cette méthodologie couvre autant la méthode de prétraitement des angiographies que les outils de vectorisation du réseau vasculaire. Par la suite, les résultats de développement des outils et méthodes de segmentation ainsi que les résultats de deux études réalisées grâce à ces outils sont présentés. La première étude utilise entre autres la segmentation des angiographies pour comparer la densité des vaisseaux sanguins entre un groupe de jeunes rats et un second de rats âgés. La deuxième étude utilise les modèles mathématiques des réseaux vasculaires pour ces deux groupes et compare des métriques liées à la morphologie des vaisseaux sanguins, à leur connexion et au réseau vasculaire. La dernière partie est une discussion critique des résultats obtenus durant ce projet de recherche. Autant les aspects techniques que les résultats scientifiques sont traités. Des recommandations liées aux projets et aux méthodes utilisées sont formulées. Pour terminer, une conclusion fait le sommaire des travaux effectués et des pistes futures sont présentées pour la suite de ce projet.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Le but de cette section est de fournir un état des lieux de la recherche dans le domaine de la neuroscience du vieillissement et plus particulièrement ce qui concerne l'étude de la microvasculature du cerveau. Elle permet de présenter les mécanismes de vieillissement sain et pathologique du cerveau, puis de montrer le lien qui existe entre ces neuropathologies et les changements de la dynamique vasculaire et ceux de la topologie de la microvasculature. Le survol des travaux effectués sur ce sujet révèle des questions qui restent encore en suspend et positionne ce projet de recherche dans ce contexte. Par la suite, différentes modalités de neuroimagerie sont présentées. Celles-ci sont séparées en 2 catégories, soient les modalités d'imagerie utilisées en clinique et les modalités optiques. Une troisième sous-section présente plus en détail la microscopie par fluorescence 2-photons puisque c'est la technique utilisée dans ce projet de recherche. Chaque modalité est présentée dans le contexte de l'étude du vieillissement du cerveau, en soulignant leur mode de fonctionnement, leurs applications principales et leurs avantages et inconvénients. La dernière section de cette revue de littérature porte sur les méthodes de traitement d'images utilisées pour segmenter des vaisseaux sanguins. Il est d'abord question des façons de rehausser le contraste de ces structures vasculaires à l'aide d'algorithmes informatiques. Finalement, différentes méthodes d'extraction des vaisseaux sanguins sont présentées.

2.1 Effets du vieillissement sur la microvasculature du cerveau

Les effets du vieillissement sur le cerveau humain se font sentir principalement au niveau cognitif. Autant le vieillissement sain que les neuropathologies liées à l'âge entraînent des modifications des fonctions cognitives par rapport aux capacités des jeunes individus. Malgré les nombreux travaux réalisés en neuroscience du vieillissement, les mécanismes à l'origine des transformations cognitives restent largement inconnus. Une hypothèse répandue dans la littérature est que les variations de la dynamique vasculaire et de la topologie de la microvasculature pourraient entraîner les adaptations fonctionnelles des aires corticales par le couplage neurovasculaire (Riddle, 2007). Discutons donc des effets du vieillissement sur le cerveau ainsi que des variations de la neurovasculature au niveau hémodynamique et morphologique.

2.1.1 Vieillessement du cerveau

Plusieurs études ont cherché à observer les effets du vieillissement sur le cerveau, autant au niveau neurophysiologique que du point de vue fonctionnel et cognitif. Il est toutefois bien difficile de discerner les effets réels du vieillissement de ceux provoqués par des maladies acquises ou développées au cours du temps (Riddle, 2007). En d'autres mots, il est difficile de définir ce qu'est un vieillissement sain, car selon le stade de vie d'un organisme plusieurs pathologies peuvent être présentes. Celles-ci peuvent être provoquées par des facteurs génétiques, par des accidents ou événements passés qui ont conditionné les tissus, par des modes de vie ou encore des habitudes qui ont influencé l'expression et la fonction des tissus. À certains stades de vie, il est possible de retrouver des tissus ayant une fonction altérée, des cancers, des dégradations apparues au cours du temps. Il faut donc bien faire attention à comparer des animaux ou des sujets qui sont au même stade de vie. La grande quantité de variables expérimentales et la difficulté de déterminer avec exactitude le profil d'antécédents des sujets d'une étude sur le vieillissement peuvent grandement influencer les résultats. On peut parfois interpréter des variations physiologiques ou cognitives comme un phénomène lié à l'âge alors qu'il s'agit peut-être d'un facteur confondant ou tout simplement d'un phénomène non lié aux mécanismes du vieillissement. Les résultats provenant de différentes études utilisant différents paradigmes ou protocoles expérimentaux sont ainsi difficilement comparables et fournissent parfois des résultats contradictoires. Ainsi, certaines études réalisées en TEP ont montré que le métabolisme du glucose (CMR_{glc}) et celui de l'oxygène (CMRO₂) dans le cerveau diminuent avec le temps (Leenders, Perani, & Lammertsma, 1990) alors que (Bentourkia et al., 2000) ont observé le contraire.

Tout de même, quelques tendances semblent faire consensus. Par exemple, il a été montré que pour un vieillissement sain, le débit sanguin cérébral de base diminue avec l'âge chez l'homme. Ce phénomène a été montré en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Ances et al., 2009) et par tomographie par émission de positron (TEP pour Tomographie par émission de positrons) (Bentourkia et al., 2000; Leenders et al., 1990). Également (Leenders et al., 1990; Y. Zhang, Peng, Chen, & Chen, 2010) ont observé une baisse du volume sanguin cérébral et une atrophie du cerveau due à un amincissement cortical et à une hypertrophie ventriculaire.

Au point de vue de la cognition, le vieillissement a entre autres des effets sur l'attention, la mémoire de travail et la mémoire à long terme. Il a été montré que les adultes âgés ont une attention amoindrie par rapport aux jeunes adultes pour des tâches qui nécessitent une division ou un transfert d'attention entre plusieurs actions. (Riddle, 2007). Aussi, la mémoire de travail diminue avec l'âge pour les tâches nécessitant une manipulation active, une réorganisation ou une intégration des informations qu'elle contient. Les principes neurophysiologiques provoquant ces dégénérescences cognitives ne sont pas connus avec précision à ce jour, mais pourraient s'expliquer par des modifications de l'hémodynamique de la microvasculature qui varie plus lentement, ou qui possède une moins grande capacité de variation face à l'activation neuronale. Il n'est pas clair pour l'instant si ce sont les modifications des fonctions primaires de la cognition qui provoquent les effets observés lors du vieillissement, ou bien si les altérations proviennent des fonctions de haut niveau (comme le langage). Pour résumer, les mécanismes neurophysiologiques sous-jacents des dégénérescences cognitives sont pour la plupart inconnus et doivent être élucidés.

En plus des effets normaux du vieillissement, de nombreuses pathologies peuvent affecter le fonctionnement du cerveau avec l'âge, dont la maladie d'Alzheimer, la démence liée aux dysfonctions vasculaires, la maladie de Parkinson, etc. Les causes de ces maladies sont encore sujettes à débat, et impliquent parfois des facteurs vasculaires. En effet, ces neuropathologies sont souvent accompagnées de pathologies des petits vaisseaux sanguins (Pantoni, 2010). Par exemple, l'observation fréquente de pathologies liées à la microvasculature chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer soulève la question du rôle de la microvasculature dans l'apparition de cette maladie (Farkas & Luiten, 2001). Certains facteurs de risques cardiovasculaires ayant été identifiés pour cette maladie sont l'artériosclérose et l'hypertension artérielle. Également, une baisse généralisée du débit sanguin cérébral est observée chez les patients atteints de cette maladie, ce qui peut mener à une baisse du métabolisme du glucose dans les régions affectées et à des effets cognitifs. La structure même des tissus formant les vaisseaux sanguins semble changer chez les personnes atteintes (Farkas & Luiten, 2001). Une bonne compréhension des mécanismes provoquant ces altérations de la neurovasculature, et leurs effets sur la neurodégénérescence associée à ces pathologies est essentielle pour obtenir une vue d'ensemble de ces maladies et identifier des voies potentielles de traitement. Bien que ce projet

n'étudie pas spécifiquement les neuropathologies du vieillissement, les techniques développées pourraient être utilisées pour étudier la microvasculature dans ces cas.

2.1.2 Modification de la dynamique neurovasculaire

Les modifications de la dynamique neurovasculaire sont toutes les variations observées dans la vasculature qui ne sont pas des altérations de la structure du réseau vasculaire en tant que tel. Ce qui est appelé ici dynamique neurovasculaire est le débit sanguin cérébral (CBF) de base, le volume sanguin cérébral (CBV), le métabolisme cérébral de l'oxygène (CMRO2) ou du glucose (CMRglc), l'amplitude de la réponse fonctionnelle en lien avec une activation neuronale, la fraction d'extraction d'oxygène (OEF), bref toutes les mesures permettant de décrire l'état du couplage neurovasculaire. Chez l'humain, ces modifications de la dynamique vasculaire s'observent en clinique à l'échelle macroscopique, c'est-à-dire que la résolution est du niveau du millimètre. Par exemple, (Aanerud et al., 2012) ont montrés en utilisant la TEP que le CBF et le CMRO2 diminuent avec l'âge chez l'humain dans la majorité des aires corticales. Ils ont aussi noté une augmentation de la fraction d'extraction d'oxygène par les vaisseaux dans quelques zones du cerveau. Une interprétation possible de ces mesures est que l'augmentation de l'OEF est un mécanisme compensatoire permettant de pallier la diminution de l'arrivée de sang oxygénée dans le cerveau. En utilisant une technique différente, la sonographie Doppler transcranienne, (Demirkaya, Uluc, Bek, & Vural, 2008) ont mesuré que la vitesse du sang dans tous les gros vaisseaux diminue chez l'humain avec l'âge. En utilisant de l'imagerie IRM fonctionnelle calibrée, (Ances et al., 2009) ont montrés que le signal BOLD (Dépendant du niveau d'oxygène sanguin), associé à la réponse fonctionnelle suite à une activation neuronale, était plus faible pour les groupes âgés. Ils ont trouvé que ce faible signal est fort probablement dû au CBF de base qui est plus bas chez les personnes âgées. Les mesures chez l'humain étant limitées aux techniques non invasives, il est difficile d'étudier l'effet du vieillissement à l'échelle micrométrique. Il faut alors se tourner vers des modèles animaux.

En utilisant l'imagerie optique multispectrale, (Dubeau, Ferland, & Gaudreau, 2011) ont observé une baisse de la réponse hémodynamique dans le cortex sensorimoteur suite à une stimulation chez le rat. La relation décrivant le rapport entre le volume sanguin cérébral et les variations du débit sanguin a démontré une différence significative entre les jeunes rats et les rats

âgés, ce qui laisse entrevoir une modification de la compliance vasculaire avec l'âge. En utilisant l'IRM-FAIR, (Mitschelen et al., 2009) ont montrés que le CBF de base dans l'hippocampe était plus élevé chez des rats ayant une légère perte cognitive au niveau de la mémoire, et que l'augmentation différentielle de la perfusion globale du cerveau sous hypercapnie (Respiration de CO₂ en plus forte concentration) était plus faible. Les auteurs expliquent cette augmentation locale du CBF par une diminution de la densité des capillaires dans l'hippocampe, ce qui crée une hypoxie (concentration d'oxygène sous la valeur optimale) locale qui est compensée par la dilatation des vaisseaux résiduels pour maintenir la perfusion. En augmentant le débit sanguin dans un réseau vasculaire ramifié, il est possible de maintenir un niveau de perfusion adéquat, car le sang désoxygéné est remplacé plus souvent. Cette hypothèse a été confirmée, comme on le verra dans la section suivante, par (R. Zhang, Kadar, Sirimanne, MacGibbon, & Guan, 2012). Finalement, (Lynch et al., 1999) ont observés que le CBF de base diminue avec l'âge et qu'une restriction calorique entraîne une augmentation du CBF de base et une augmentation de la densité vasculaire (une modification topologique de la vasculature pour compenser la carence calorique imposée aux animaux). Malgré ces modifications de la dynamique neurovasculaire et de la topologie du réseau vasculaire anatomique (VAN), l'augmentation du CBF sous hypercapnie était faible, voire nulle. Ceci indique que les vaisseaux ne pouvaient pas être dilatés davantage chez les rats âgés et restreints en calories, ou bien que les mécanismes de régularisation du débit sanguin sont modifiés sous ces conditions.

Ce qui ressort des quelques exemples cités plus haut est le rôle important que joue le système vasculaire dans les mécanismes de vieillissement du cerveau. Le couplage neurovasculaire, décrivant l'interaction entre le réseau glial-vaisseau, les tissus cérébraux et l'activité neuronale, est donc un aspect central à considérer lors de l'étude de ces pathologies (Iadecola, 2004). Ce mécanisme est aussi le principe de fonctionnement de la majorité des techniques d'imagerie fonctionnelle du cerveau (Buxton, Uludağ, Dubowitz, & Liu, 2004; Buxton, 2010). Quelques travaux ont étudié l'effet du vieillissement sur ce couplage. Par exemple, une équipe de recherche a montré que ce couplage ne semble pas être affecté par le vieillissement normal (Rosengarten, Aldinger, Spiller, & Kaps, 2003), ce qui implique qu'il existe certains mécanismes compensatoires pour pallier les effets de la baisse de débit cérébral observée. Ce couplage semble toutefois être affecté par l'hypertension artérielle, par la maladie d'Alzheimer ou par des accidents cérébraux vasculaires localisés (Girouard & Iadecola, 2006).

Au point de vue préventif, l'activité aérobique semble avoir des effets bénéfiques sur les pertes cognitives, en améliorant l'efficacité des processus neuronaux ou en augmentant les ressources métaboliques disponibles pour l'exécution des tâches neuronales. L'effet semble être le plus important dans le cortex préfrontal associé au contrôle de l'attention (Riddle, 2007). On voit donc qu'une bonne compréhension du couplage neurovasculaire pourrait avoir des effets autant sur le diagnostic des neuropathologies que sur la prévention de ces maladies via la santé du système cardiovasculaire. Pour avancer l'étude du couplage neurovasculaire, des outils mathématiques ont été développés pour modéliser à l'échelle micrométrique l'effet de la vasculature sur la perfusion du cerveau (Boas, Jones, Devor, Huppert, & Dale, 2008; Dubeau, Desjardins, et al., 2011; Fang et al., 2008). Ces méthodes de simulation doivent cependant utiliser une représentation de la microvasculature la plus fidèle possible afin de pouvoir étudier son effet sur le cerveau et tirer des conclusions neurophysiologiques adéquates. Les outils développés dans ce projet s'inscrivent dans la démarche de l'étude du vieillissement du cerveau puisqu'ils permettent d'obtenir ces modèles du réseau vasculaire anatomique à partir d'angiographies du néocortex.

2.1.3 Modification de la topologie du réseau vasculaire

Comme on peut le constater, plusieurs modifications de la dynamique neurovasculaire apparaissent au cours du vieillissement. Bien que ces effets soient utiles pour anticiper les impacts cognitifs et fonctionnels, ils ne sont pour la plupart que les symptômes et non les causes d'un mécanisme de dégénérescence. Il faut se tourner du côté de la topologie du réseau vasculaire et de ses composants pour approfondir notre compréhension du vieillissement du cerveau. D'abord, plusieurs types de lésions peuvent affecter la microvasculature et les tissus cérébraux (Rincon & Wright, 2014) : les infarctus du cortex profond (que ce soit de manière isolée ou chronique), les lésions de la matière blanche et les micros saignements cérébraux. Ces lésions sont observables avec des modalités d'imagerie clinique (CT, IRM) et commencent à être associées à des facteurs génétiques et environnementaux en plus du vieillissement. Suite à une série d'études de cas et d'observations, ces pathologies des petits vaisseaux (SVD pour *Small Vessel Diseases*) ont été associées à la présence de dégradations cognitives liées à la vasculature (Huijts et al., 2013). Lorsque ces lésions apparaissent, un processus biologique et moléculaire se met en branle pour remplacer et/ou enlever les tissus affectés. Par exemple, suite à un micro-infarctus les macrophages retirent les tissus morts, ce qui laisse des fragments de vaisseaux et

des trous dans la vasculature. Ceci a bien sûr une incidence sur la dynamique vasculaire et l'efficacité de l'apport de nutriments vers les tissus neuronaux.

En plus des pathologies affectant les petits vaisseaux, il a été montré que même pour un vieillissement sain la densité des vaisseaux sanguins dans le cerveau tend à diminuer avec l'âge. Par exemple, (R. Zhang et al., 2012) ont montré que suite à un test de Morris (Labyrinthe aquatique) réalisé avec deux cohortes de rats d'âge différents (jeunes et âgés), le groupe âgé a démontré une déficience au niveau de la mémoire. Par la suite, des analyses histologiques immunochimiques de l'hippocampe ont révélé une dégénérescence de la vasculature des individus âgés, sans signes de neurodégénérescence. La modification de la vasculature des rats âgés apparaît sur les histologies comme des capillaires fragmentés et déconnectés. La présence d'altérations du réseau glial vasculaire dans le cerveau sans apparition de neurodégénérescence laisse entrevoir le rôle de mécanisme précurseur que pourraient jouer les pathologies des petits vaisseaux dans l'apparition de neuropathologie et de leurs effets cognitifs. Également, (Lynch et al., 1999) ont montré que la densité des capillaires augmente lorsque les rats suivent un régime réduit en calories. Une raison possible permettant d'expliquer la différence de densité vasculaire entre les jeunes et les vieux est une modification des mécanismes de plasticité vasculaire. En effet, les facteurs de croissance des vaisseaux sanguins semblent être moins exprimés chez les individus âgés (Sonntag, Lynch, Cooney, & Hutchins, 1997), ce qui à la longue entraîne la fracturation du réseau vasculaire, puisque les vaisseaux ne sont plus remplacés suite aux pathologies touchant le système vasculaire. Une voie thérapeutique est d'ailleurs proposée pour ralentir cet effet, qui se base sur le fait que l'activité des aires corticales semble être corrélée à la croissance vasculaire (Riddle, 2007). Ainsi, des exercices cognitifs répétés visant certaines fonctions cérébrales pourraient permettre de ralentir la dégénérescence vasculaire et ainsi l'apparition de neuropathologie.

Pour résumer, le vieillissement du cerveau chez l'homme est associé à l'apparition graduelle de limitations des fonctions cognitives, qui peuvent entre autres toucher l'attention, la mémoire de travail et la mémoire à long terme. En plus de ces effets fonctionnels, on remarque une diminution du débit sanguin cérébral de base et du métabolisme de l'oxygène par le cerveau. Le concept permettant de lier les effets cognitifs et fonctionnels aux effets vasculaires est le couplage neurovasculaire. L'hypothèse sous-jacente ici est que les pathologies affectant les petits vaisseaux sont soit à l'origine des effets cognitifs du vieillissement sain, soit un facteur de risque

additionnel. Les modifications de la topologie du réseau vasculaire, que ce soit au niveau de la densité des vaisseaux ou de leur structure, seraient à l'origine des changements observés de la dynamique neurovasculaire.

2.2 Techniques d'imagerie du cerveau

De nombreuses techniques d'imagerie peuvent être utilisées pour mesurer la neurovasculature et le cerveau. Certaines sont utilisées de façon routinière en clinique, alors que d'autres sont pour l'instant réservées au milieu de la recherche, car elles sont soit invasives, soit expérimentales ou bien adaptées à l'étude des petits animaux. Dans la section qui suit, les modalités d'imagerie utilisées en clinique sont d'abord présentées. Ensuite, les modalités optiques qui sont fréquemment utilisées sont mentionnées. Finalement, la microscopie par fluorescence 2-photons est expliquée plus en détail puisqu'il s'agit de la technique d'imagerie à l'origine des angiographies étudiées dans ce projet. Pour chaque modalité, les principes de fonctionnement de la technique sont introduits brièvement. Puis quelques applications principales sont présentées, en insistant sur les travaux spécifiques réalisés en vieillissement. L'accent est mis sur la mesure de la vasculature dans le cerveau, que ce soit au niveau global ou à l'échelle micrométrique.

2.2.1 Modalités utilisées en clinique

La tomodensitométrie, communément appelée CT-scan ou simplement CT (pour *Computed Tomography*), est une technique d'imagerie utilisant des rayons ionisants dans le domaine des rayons X. Elle se base sur l'atténuation des rayons X lorsqu'ils traversent les tissus (Prince & Links, 2006). Une source de rayon X émet un mince faisceau de radiation vers le patient. Un détecteur placé derrière le patient récolte des rayons après qu'ils aient traversé les tissus. L'intensité du faisceau incident est atténuée en fonction des propriétés d'absorption de la matière rencontrée. Ce système source-détecteur tourne autour de la table d'imagerie afin de mesurer l'atténuation des rayons à différents angles d'incidence. Ensuite, une carte 2D des valeurs d'atténuation est reconstruite à l'aide de calcul tomographique réalisé par un ordinateur. En déplaçant le système source-détecteur le long de l'axe AP (Antérieur-Postérieur), plusieurs tranches 2D sont reconstruites et en les combinant numériquement un volume de l'objet imagé

est acquis. Ce volume est une carte d'atténuation des rayons X du tissu. En injectant dans les vaisseaux sanguins un agent de contraste opaque aux rayons X, il est possible de mesurer une angiographie. Les principales structures pouvant être étudiées avec cette technique sont les structures osseuses, les organes internes, le système. Cette technique est également utilisée en radio-oncologie pour déterminer les tailles de tumeurs et planifier les traitements de radiothérapie. Plus particulièrement, en neuroimagerie cette technique peut être utilisée pour détecter les petits anévrysmes dans le cerveau (Cloft & Kallmes, 2003). Elle est également parfois utilisée avec les petits animaux pour effectuer des angiographies (Badea & Drangova, 2008). Le CT permet de visualiser la morphologie des tissus, mais ne permet pas d'effectuer des mesures fonctionnelles. Son caractère ionisant rend également difficiles les études longitudinales. Le principal désavantage de cette technique est en effet que les rayons X utilisés pour imager les patients sont ionisants et peuvent donc entraîner des effets néfastes pour les tissus selon le temps d'exposition et la quantité de séances d'imagerie.

La tomographie par émission de positrons utilise le phénomène d'annihilation d'un positron avec un électron pour étudier le métabolisme des organes (Prince & Links, 2006). D'abord, une molécule marquée par un atome radioactif est injectée dans le patient. Par exemple, du glucose dont certains atomes ont été remplacés par un isotope de masse atomique différente est parfois utilisé. Lorsque l'atome radioactif se désintègre, il émet le surplus d'énergie sous forme d'un positron. Cette particule effectue un court parcours, jusqu'à ce qu'il rencontre un électron. Il y a alors annihilation, suivie de l'émission de 2 rayons gamma de directions opposées et d'un neutrino. Lorsque le détecteur observe 2 rayons gamma de façon instantanée, il connaît la « ligne » d'événement où a eu lieu la désintégration. En accumulant la détection d'événements simultanés et en utilisant un algorithme de reconstruction exploitant le fait que la ligne d'événement est connue, il est possible d'obtenir une carte 2D dont le contraste est corrélé à la quantité d'événements de désintégration de la molécule injectée. Tout l'intérêt de cette technique réside dans l'utilisation de la molécule radioactive. Selon le choix effectué, on peut cibler différentes fonctions du métabolisme. Le glucose représente la source d'énergie principale dans le cerveau. Une carte de désintégration associée au glucose représente l'activation neuronale, car une plus grande activité nécessite un plus grand apport énergétique. Cette technique est principalement utilisée en imagerie fonctionnelle et pour détecter des masses tumorales. Par le principe de fonctionnement de cette technique, les résolutions spatiale et temporelle sont limitées.

Quelques études mentionnées plus haut, dont (Aanerud et al., 2012; Leenders et al., 1990), utilisent cette modalité d'imagerie pour étudier l'effet du vieillissement sur le métabolisme du glucose dans le cerveau. Le TEP sert aussi parfois à obtenir des cartes d'activation neuronale associée à une tâche et pour déterminer l'effet du vieillissement sur les fonctions cognitives.

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) utilise des champs magnétiques puissants et des séquences de radiofréquences afin d'exciter les spins nucléaires au sein des tissus et ensuite mesurer leur temps de relaxation vers l'état d'équilibre (Prince & Links, 2006). Les deux principaux temps de relaxation mesurés sont la relaxation T1 et la relaxation T2. Selon le type de séquence, différentes structures seront rehaussées. La séquence « inversion-récupération » permet par exemple d'annuler le signal dans les vaisseaux sanguins. Ainsi, il est possible de mesurer l'angiographie de tout le cerveau avec cette technique. La résolution de l'IRM est limitée par les caractéristiques des gradients, par des limites d'exposition physiologique, par le temps de mesure... Le principal avantage de l'IRM est qu'elle n'utilise pas de radiofréquence ionisante. Toutefois, les temps de mesures doivent parfois être très longs pour obtenir un bon ratio signal sur bruit (SNR). Cette modalité, selon les séquences, permet d'effectuer des études de morphologie des vaisseaux sanguins et des tissus cérébraux. De nombreuses études ont été effectuées dans le domaine du vieillissement en utilisant cette modalité d'imagerie. D'autres séquences importantes sont l'Imagerie du tenseur de diffusion qui permet entre autres de suivre les fibres neuronales dans le cerveau et la moelle épinière, et les séquences ASL qui permettent de mesurer la perfusion du cerveau en étiquetant les spins dans une tranche du cou (artère) et en observant leur propagation dans le cerveau.

L'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique (IRMf) est une branche de l'IRM très utilisée en neuroscience. La séquence BOLD est au centre de cette technique. Celle-ci se base sur le couplage neurovasculaire pour mesurer des variations de débit sanguin dans le cerveau et les corréler à une activité neuronale localisée à cet endroit (Devor, Boas, Einevoll, Buxton, & Dale, 2012). Tout comme l'IRM pour l'imagerie des structures cérébrales, l'IRMf est considérée comme le « Gold Standard » en imagerie fonctionnelle. Les principales utilisations de cette technique sont liées à la neuropsychologie et à l'étude de la cognition. Il existe de nombreuses façons d'utiliser les résultats, dont l'étude des connexions entre différentes régions du cerveau pour des tâches spécifiques, l'étude du niveau de base du métabolisme, étude de la plasticité du

cerveau après un accident cérébral vasculaire, étude de développement du cerveau, etc. Dans le domaine du vieillissement, l'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique a entre autres été utilisée par (Ances et al., 2009) pour mesurer le CBF et l'augmentation du signal BOLD en réponse à l'hypercapnie et évaluer les différences dans ces mesures entre des individus d'âge différents. (Mitschelen et al., 2009) ont également utilisé cette technique pour montrer que les modifications de la perfusion du cerveau mesurée par IRMf pourraient être un prédicteur des effets cognitifs du vieillissement.

Toutes ces techniques, par leur niveau de développement et la réduction des coûts associés à leur exploitation, sont des modalités très utilisées chez l'humain en clinique. L'avantage principal de l'IRM et de l'IRMf est qu'elles ne sont pas invasives, ce qui rend beaucoup moins dangereuses les études longitudinales et les mesures répétées sur le cerveau en comparaison à l'imagerie CT et PET. Malgré tout, ces deux dernières techniques sont utilisées couramment en médecine nucléaire et en radiothérapie et elles demeurent essentielles afin de bien faire le lien entre les différentes observations. La résolution est limitée et d'autres techniques doivent être utilisées afin de pouvoir étudier les mécanismes neurophysiologiques responsables des dégénérescences cognitives liées au vieillissement à l'échelle microscopique. C'est ce qui mène à l'utilisation de modalités d'imagerie optiques.

2.2.2 Modalités optiques

La modalité optique la plus utilisée et qu'on peut considérer comme un « Gold Standard » dans le domaine de l'étude des pathologies est *l'histologie*. Elle utilise un microscope conventionnel et divers procédés pour étudier de minces tranches d'un échantillon biologique fixé et dont certaines structures sont révélées à l'aide d'un agent de contraste. En plus d'être une technique invasive (et parfois même nécessitant le sacrifice de l'animal à étudier), cette technique ne permet pas d'étudier les tissus en action dans leur contexte biologique (c'est-à-dire *in vivo*). Également, les coupes histologiques peuvent endommager les microstructures ce qui rend plus difficile la compréhension des phénomènes. Finalement, l'étude de tranches 2D isolées empêche la représentation tridimensionnelle des structures, ce qui est un facteur limitant dans l'étude de la neurophysiologie et de la microvasculature du cerveau. Tout de même, plusieurs études utilisent des mesures histologiques, soit pour apporter des informations supplémentaires sur la pathologie

observée à l'aide d'une autre technique, soit pour confirmer des conclusions d'une autre modalité. L'histologie optique a par exemple été utilisée pour vérifier l'état du réseau glial vasculaire dans l'hippocampe chez des rats jeunes et âgés (R. Zhang et al., 2012). Cette étude a entre autres révélé que le réseau vasculaire au sein de l'aire de la mémoire était dégradé, même si aucune neurodégénérescence n'était visible à ce stade. Cette dégénérescence vasculaire laisse entrevoir qu'elle serait peut-être un signe précurseur du développement de neuropathologie plus tard au cours du vieillissement.

La microscopie confocale est une façon d'étudier les tissus dans leur contexte biologique avec une résolution sous-millimétrique. Dans cette technique, un laser est focalisé dans un échantillon à l'aide d'un objectif de microscope. La lumière issue de la PSF (Fonction d'étalement du point) est réfléchi par les tissus et retourne vers le montage optique. L'intensité du faisceau réfléchi est recaptée et est focalisée sur un sténopé dont la taille est la plus petite possible. Le sténopé permet d'effectuer un sectionnement optique, c'est-à-dire qu'il sert à limiter la position Z (en profondeur) d'où proviennent les faisceaux lumineux. Suite au sténopé un détecteur capte la lumière revenant de l'échantillon. En balayant le microscope à l'aide de miroirs galvanométriques, et en variant la distance Z entre le microscope et l'échantillon, on peut reconstruire un volume tridimensionnel du tissu observé, dont l'intensité de chaque voxel est liée aux propriétés optiques à cet endroit. La résolution pouvant être atteinte par cette technique est déterminée à la fois par les limites de diffraction du montage optique utilisé, par la taille de la PSF, par le ratio signal sur bruit, et par les propriétés d'absorption et de diffusion des tissus qui atténuent l'intensité de la lumière qui y voyage. En particulier, la loi de Beer-Lambert décrit l'atténuation de l'intensité d'un faisceau lumineux dans de la matière dont le coefficient d'atténuation totale est μ_t . La diminution de l'intensité est exponentielle avec la distance parcourue. À une certaine profondeur dans l'échantillon, l'atténuation de la lumière captée est telle que le signal n'est plus suffisant pour être distingué du bruit. Ainsi, en microscopie confocale par réflexion la profondeur de pénétration dans un milieu diffusant est typiquement de quelques centaines de micromètres (L. V. Wang & Wu, 2007). Il existe diverses façons de moduler le contraste des structures mesurées par microscopie confocale. On peut bien entendu utiliser la réflexion du signal tel que présenté plus haut. Aussi, en injectant un agent fluorescence ou des molécules pouvant se lier à certains tissus, on peut effectuer des mesures de fluorescences. Il suffit alors d'ajouter un miroir dichroïque au montage afin de séparer le signal d'excitation du

signal de fluorescence. Quelques inconvénients de cette technique sont : (1) SNR limité par le sténopé, (2) pollution du signal d'émission par le signal d'excitation, (3) pénétration faible par rapport aux techniques traditionnelles (donc nécessite chirurgie pour révéler la surface du cerveau). En neuroscience du vieillissement, la microscopie confocale a entre autres été utilisée par (Lorthois, Lauwers, & Cassot, 2014) pour étudier la tortuosité et les propriétés des artérioles et des veinules dans le cortex et établir quels pourraient être leur utilité en tant que biomarqueurs de certaines pathologies. Cette modalité a également été utilisée avec un système d'histologie automatique pour reconstruire la structure d'un cerveau entier (Kleinfeld et al., 2011).

L'imagerie optique intrinsèque est principalement utilisée pour visualiser l'activité neuronale des aires corticales et leur architecture (Zepeda, Arias, & Sengpiel, 2004). La surface du cerveau est éclairée à l'aide d'une illumination homogène et le signal réfléchi est mesuré par une caméra CCD. Les changements des propriétés intrinsèques des tissus du cortex (p. ex. réflectance) sont reliés à l'activité neuronale locale. Cette technique permet donc d'obtenir une carte étendue de l'activité neuronale associée à une tâche particulière ou à certaines pathologies. Certains paramètres physiologiques qui peuvent influencer le taux de réflexion de la lumière incidente sont les changements de volume sanguin et le ratio d'hémoglobine oxy/désoxygénée et la diffusion de la lumière. Le choix des longueurs d'onde, de la distribution du patron d'illumination et la séquence d'illumination dépendent du biomarqueur utilisé et du contexte étudié. Cette technique nécessite parfois la création d'une craniotomie afin de pouvoir observer la surface du néocortex. Une chambre étanche est alors installée pour protéger la surface du cerveau des infections et autres problèmes pouvant survenir lorsque le cortex est exposé. Cette technique a été utilisée pour étudier l'architecture fonctionnelle de différentes aires corticales (olfactive, auditive, visuelle...), la plasticité du cerveau suite à un micro-ACV, l'épilepsie et le développement du cerveau. Cette technique est utilisée autant sur les animaux que chez l'humain. Pour une présentation détaillée de cette technique et de ces applications principales, se référer à la revue de littérature (Zepeda et al., 2004). Les principaux avantages de l'imagerie optique intrinsèque sont la possibilité de répéter des mesures sur un même animal sur une longue période de temps (semaine, voire mois) et d'obtenir une carte élargie de l'activité de plusieurs colonnes corticales lors d'une même expérience. L'imagerie optique intrinsèque a déjà été utilisée dans ce laboratoire pour observer la dynamique neurovasculaire chez des modèles murins de vieillissement sain (Dubeau, Ferland, et al., 2011).

La tomographie par cohérence optique (OCT) est un dispositif qui utilise un interféromètre pour réaliser le sectionnement optique du microscope. Son principe de fonctionnement est le suivant : un laser envoie un faisceau de lumière vers un séparateur de faisceau. Un des bras optiques est dirigé vers l'échantillon alors que le second va en direction d'un miroir. Les deux bras possèdent exactement la même distance. Après réflexion de la lumière dans l'échantillon, la lumière retourne vers le séparateur de faisceaux. Les deux faisceaux sont réunis et se dirigent vers un détecteur. Les interactions subites dans l'échantillon ont provoqué un petit déphasage en comparaison du bras de référence, de sorte qu'on observe une interférence entre le signal de référence et le signal provenant de l'échantillon. En variant la distance du miroir dans le bras de référence, on peut obtenir le patron d'interférence associé à l'endroit étudié dans l'échantillon. En enregistrant, le patron d'interférence de la longueur du bras de référence permet donc d'obtenir le profil de réflexion en fonction de la profondeur (L. V. Wang & Wu, 2007). On peut aussi utiliser l'OCT dans le domaine de Fourier en utilisant une source à faible cohérence puis en utilisant un spectromètre plutôt qu'un détecteur conventionnel. Chaque longueur d'onde contenue dans le faisceau de lumière sera au focus à une profondeur légèrement différente, donc chaque couleur contient la réflectance de l'échantillon à diverse profondeur. Cette modalité peut être utilisée pour étudier la physiologie des vaisseaux du néocortex (Srinivasan et al., 2011), pour mesurer la pression d'oxygène dans les tissus cérébraux (Sakadzic et al., 2014) ou pour établir les modifications de compliance des vaisseaux sanguins pour des souris artérosclérotiques (Baraghis et al., 2011).

La tomographie photoacoustique combine le contraste optique et la résolution du signal ultrason (Xu & Wang, 2006). Un laser est focalisé dans un échantillon, dans lequel peut être injecté un agent de contraste se liant à certaines molécules ou structures biologiques. Un très court pulse est envoyé qui réagit avec l'échantillon au point focal. Un transfert d'énergie rapide survient. Ce dépôt rapide d'énergie se transforme en onde de pression qui est ensuite captée par un transducteur ultrason. En utilisant un algorithme, il est possible de reconstruire le volume. Les avantages de cette modalité sont : (1) la dispersion du signal ultrason dans les tissus biologiques est de 2-3 ordres de grandeur inférieurs à celle du signal optique, (2) le contraste pouvant être exploité grâce à l'utilisation de fluorophore fonctionnalisé, (3) la profondeur et la résolution dépendent de la fréquence ultrason. Cette technique est toutefois très récente et les principales études réalisées en neuroscience sont des preuves de concepts. Certaines applications de

l'imagerie photoacoustique sont : détection du cancer du sein, imagerie des petits animaux, imagerie de cerveaux de souris ex vivo (Lou, Xia, & Wang, 2014), l'imagerie du métabolisme du cerveau de souris in vivo (Yao et al., 2013) ou l'imagerie du couplage neurovasculaire chez la souris (Hu & Wang, 2010) .

2.2.3 Microscopie par fluorescence 2-photons

La microscopie par fluorescence 2-photons est la modalité d'imagerie utilisée pour acquérir les angiographies étudiées dans ce projet. Son principe de fonctionnement est donc présenté plus en détail afin de bien comprendre les avantages et limitations de cette technique. Quelques travaux de neurosciences réalisés à l'aide de cette modalité sont également présentés.

Le phénomène non linéaire consistant en l'interaction de 2 photons avec la matière a été prédit de façon théorique par Maria Göppert-Mayer en 1931. En fluorescence 2-photons, 2 photons interagissent avec une même molécule, transférant leur énergie à un électron qui est promu vers un niveau énergétique supérieur. L'intervalle d'énergie entre le niveau de base et le niveau excité est 2 fois le niveau d'énergie d'un photon incident ($\Delta E = 2\hbar\nu$). À partir du niveau excité, l'électron peut subir une relaxation non radiative jusqu'à ce qu'il retourne à un niveau fondamental via une transition permise selon la mécanique quantique. Il émet alors un photon de fluorescence dont l'énergie équivaut approximativement à la somme de l'énergie de deux photons d'excitation (les pertes d'énergie non radiative sont responsables de la différence). Ainsi, si on excite une molécule à l'aide d'un laser dans le proche infrarouge ($\lambda \approx 800 \text{ nm}$), la fluorescence émise suite à une excitation deux photons aura environ une longueur d'onde de 400 nm . Il suffit alors d'utiliser un filtre optique pour séparer les photons émis par fluorescence des photons d'excitation (L. V. Wang & Wu, 2007).

La probabilité d'interaction entre 2 photons est proportionnelle au carré de l'intensité incidente, ce qui fait que le volume d'excitation est plus petit que dans le cas de la fluorescence conventionnelle (c.-à-d. à 1 photon) pour un même faisceau d'excitation. Ceci permet donc de connaître avec précision l'endroit d'où provient le signal de fluorescence selon la configuration du système optique utilisé. Ainsi, au point de vue expérimental le fonctionnement du microscope biphotonique est essentiellement le même que celui d'un microscope confocal, la grande

distinction étant la façon d'effectuer le sectionnement optique. Tel que mentionné précédemment, le microscope confocal utilise un sténopé afin de limiter la région d'où proviennent les photons mesurés. Au contraire, le microscope 2-photons exploite le phénomène non linéaire décrit plus haut pour limiter la provenance du signal de fluorescence. Il est ainsi possible de s'affranchir du sténopé et d'obtenir un meilleur ratio signal sur bruit. On peut tout de même utiliser un microscope à fluorescence 2-photons en mode confocal. Ceci permet de diminuer la taille de la PSF de fluorescence, augmentant la résolution. Toutefois, on se retrouve à diminuer le SNR. Pour des échantillons optiquement minces, cela reste avantageux, mais l'avantage disparaît lorsqu'on étudie des échantillons optiquement épais (ou ayant beaucoup de diffusion). Dans ce cas, il vaut mieux utiliser le microscope 2-photons en mode conventionnel. Les échantillons biologiques et les tissus *in vivo* sont généralement diffusants, donc un microscope cherchant à observer ces tissus aurait l'avantage de travailler en mode conventionnel.

Il est possible de calculer analytiquement la PSF d'un microscope 2-photons (Masters & So, 2008). Sans sténopé (en mode conventionnel), les largeurs à mi-hauteur (FWHM pour *Full Width at Half Maximum*) des PSF axiale et radiale sont environ 2 fois plus grandes que pour le microscope confocal. Lorsqu'il est utilisé en mode confocal, ces FWHM sont environ 1.15 fois plus grande. En termes de résolution, la résolution axiale d'un deux-photon conventionnel est environ le double de celle d'un confocal 1-photon (~1.2 fois pour le confocal 2-photon) et la résolution radiale est deux fois plus petites pour le 2-photon conventionnel que pour le confocal (0.8 pour le 2-photon confocal).

Plusieurs molécules peuvent être utilisées pour rehausser le contraste ou la probabilité d'interaction deux-photons. D'abord, on peut exploiter les fluorophores intrinsèques déjà présents dans les tissus biologiques (tels que NADH, flavine, mononucléotide, ...). Toutefois, l'efficacité quantique de ces fluorophores intrinsèques est généralement faible. Les nanoparticules (points quantiques...) peuvent aussi être utilisées. Ces particules sont celles qui possèdent la meilleure probabilité d'interaction 2-photons et peuvent être jusqu'à 5000 fois plus brillantes que les fluorophores conventionnels. Toutefois, ces molécules sont relativement grandes, peu solubles et parfois toxiques. Une autre approche est d'utiliser des protéines modifiées génétiquement afin qu'elles expriment un fluorophore. Le plus commun est le GFP. Finalement, il est possible d'utiliser des agents de contraste organiques conventionnels (soit par injection). Parfois ces agents

de contraste possèdent un faible rendement quantique en 2-photons et certains sont moins stables (ils cessent de fluorescer par photoblanchiment) (Masters & So, 2008).

L'avantage principal de la microscopie 2-photons réside dans le fait que les longueurs d'onde plus élevées utilisées par cette technique sont moins affectées par la diffusion et l'absorption dans les tissus biologiques que les fréquences utilisées en microscopie à fluorescence ou confocale. Cela permet d'imager plus profondément dans les échantillons que si un microscope confocal conventionnel était utilisé. En effet, la loi de Beer-Lambert représente la perte d'intensité d'un faisceau lumineux en fonction de sa longueur de parcours optique dans un échantillon. Cette baisse d'intensité est exponentielle. Un second avantage réside dans la configuration conventionnelle du microscope, c'est-à-dire sans sténopé. Ceci permet de récolter plus de signaux provenant du volume focal, et ainsi le SNR est augmenté. Finalement, puisqu'il s'agit d'une technique en fluorescence, la longueur d'onde détectée n'est pas la même que celle d'excitation. La grande différence d'énergie entre ces deux longueurs d'onde en deux-photons rend beaucoup plus facile leur séparation par un filtre optique, limitant au maximum la pollution du signal d'intérêt par les photons d'excitation. Mais surtout, connaissant avec précision la position d'où sont émis les photons de fluorescence, cette position étant codée temporellement par le balayage du microscope, on peut utiliser un objectif à grande ouverture numérique et il n'est pas nécessaire de « dé-scanner » le signal mesuré. En effet, on peut considérer que tous les photons collectés possédant l'énergie de fluorescence utilisée ici proviennent du point focal. Ceci rend le montage plus simple à réaliser.

La microscopie à fluorescence 2-photons est tout de même affectée par différentes sources de bruit et plusieurs facteurs peuvent faire varier le signal mesuré par rapport au signal idéal. On peut distinguer les sources intrinsèques, liées aux tissus et à leurs caractéristiques, des sources extrinsèques, liées au montage expérimental et à l'acquisition des données. Discutons d'abord des sources de variabilités intrinsèques. Certaines molécules et protéines qui existent dans les tissus biologiques peuvent interagir avec le signal d'excitation et émettre des photons de fluorescence. Certaines possèdent également une probabilité d'interaction 2-photons non nulle. L'efficacité quantique de ces fluorophores naturels est généralement plus faible que celle des agents de contraste injectés dans les vaisseaux sanguins, mais ils peuvent tout de même introduire une certaine variation dans l'intensité mesurée. De plus, plusieurs propriétés des tissus peuvent

affecter la propagation des photons en leur sein. Par exemple, l'hémoglobine possède un grand coefficient d'absorption, c'est-à-dire qu'un faisceau de lumière traversant un vaisseau sanguin sur une distance L diminue d'intensité plus rapidement que s'il se propage dans l'air. Aussi, le milieu biologique est diffusant. La combinaison de ces deux facteurs (absorption, diffusion) diminue l'intensité du signal mesuré, et donc diminue le SNR. À une certaine profondeur (~ 500 microns pour les énergies utilisées), le signal est trop atténué et il devient difficile de le distinguer du bruit. C'est principalement ce facteur qui limite la profondeur à laquelle il est possible d'observer les vaisseaux sanguins dans un angiogramme acquis par microscopie optique. Il est possible d'ajuster le gain du détecteur en fonction de la profondeur afin de compenser cet effet. Toutefois en agissant ainsi, on intensifie une autre source de bruit : le bruit multiplicatif lié au fonctionnement du détecteur.

Dans un même ordre d'idée, le grand coefficient d'absorption du sang introduit d'autres particularités dans les angiographies qui éloignent l'apparence des vaisseaux sanguins du cas idéal. Notons d'abord que pour plusieurs animaux, il est nécessaire d'effectuer une chirurgie afin d'enlever une partie du crâne et de la dure-mère afin de pouvoir imager le cerveau. En effet, ces structures sont hautement absorbantes et diffusantes et empêchent d'imager les tissus qu'elles recouvrent. Une conséquence de ces chirurgies est la présence potentielle de saignement à la surface de la partie exposée. Ce saignement n'est pas nécessairement distribué de façon uniforme et diminue donc l'intensité du signal optique en conséquence. De façon analogue, la présence de plusieurs vaisseaux sanguins superposés, ou d'une artériole ayant un grand diamètre au-dessus d'un lit de capillaires, entraîne un effet d'ombrage qui diminue grandement la quantité de photons d'excitation pouvant se rendre sous ces vaisseaux, et diminuent d'autant plus la quantité de photons de fluorescence pouvant être recaptés par les détecteurs. Le ratio signal sur bruit sous les artérioles de surface est donc plus bas que pour des régions de même profondeur, mais non recouvertes de grands vaisseaux. Finalement, un dernier facteur intrinsèque affectant la qualité des angiographies est la distribution du fluorophore dans la vasculature, qui devrait être uniforme, mais qui peut varier d'une région à l'autre tout dépendant de la topologie de la vasculature, de la présence de globules rouges, des processus de perfusion, etc. De plus, la concentration et les propriétés d'un fluorophore à un endroit dans les tissus peut varier selon différentes échelles de temps et différents processus, que ce soit via des processus de relaxation suite à l'absorption de 2 photons (Échelle pico & nanosecondes), des réactions chimiques ou la diffusion de l'agent de

contraste dans les tissus (micro et milliseconde) ou bien des processus biologiques affectant ces molécules (secondes, minutes, heures) (Masters & So, 2008).

Les sources d'erreurs extrinsèques proviennent principalement du montage optique et des détecteurs utilisés. Les erreurs liées au montage sont la diffraction par les composants optiques, les problèmes d'alignement, l'introduction d'aberration chromatique selon les lentilles utilisées. Il peut également y avoir de la réflexion à la surface de l'échantillon qui sature le détecteur et rend difficile l'imagerie des vaisseaux à cet endroit. Le bruit introduit par le détecteur consiste en du bruit quantique (*Photon Shot*) suivant une distribution de Poisson, le bruit thermique (*Dark-noise*) suivant également une distribution de Poisson, et le bruit multiplicatif de Johnson qui est dû aux processus stochastiques liés au gain du détecteur (Masters & So, 2008). Le défi d'une méthode d'extraction des réseaux vasculaires à partir d'un angiogramme 2-photons est donc d'être assez robuste, fiable et reproductible pour surmonter ces diverses sources de bruit et de variabilité sans introduire trop d'erreurs dans la structure du graphe calculé.

Dans la revue de littérature (Shih et al., 2012), plusieurs études portant sur l'imagerie par microscopie 2-photons du couplage neurovasculaire sont recensées. Cet article présente également de façon détaillée comment se déroule une expérience, en décrivant les chirurgies, les procédures de numérisation, les problèmes pouvant être rencontrés, etc. La microscopie 2-photons peut être utilisée pour mesurer la dynamique du débit sanguin dans des vaisseaux corticaux, pour mesurer le niveau de base hémodynamique de souris au repos et lors d'une tâche, pour mesurer l'activité simultanée du débit sanguin et de l'activité cellulaire dans une région, pour mesurer le comportement des muscles lisses entourant les vaisseaux, pour mesurer la distribution d'oxygène dans les tissus ou pour étudier l'effet de micro caillot induit optiquement ou de l'ablation d'un vaisseau sanguin sur la répartition du débit sanguin (Schaffer et al., 2006), etc. Le microscope peut être intégré à un montage histologique robotisé afin d'effectuer des histologies d'un cerveau entier pour obtenir son connectome (où la cartographie des neurones qu'il contient; (Kleinfeld et al., 2011)). Bien sûr, lorsqu'un agent de contraste est introduit dans le sang la microvasculature à la surface du cerveau peut être mesurée (Tsai et al., 2009). D'autres applications en neuroscience sont possibles, pour plus d'exemple se référer au chapitre 28 du livre (Masters & So, 2008).

2.3 Segmentation des vaisseaux sanguins

Quelques techniques d'imagerie présentées dans la section précédente permettent de mesurer la neurovasculature en trois dimensions. Lorsqu'un angiogramme est formé, plusieurs méthodes de traitement d'image peuvent être utilisées pour rehausser le contraste des vaisseaux sanguins. Les diverses approches utilisées sont présentées dans la première sous-section. Ensuite, quelques techniques d'extraction des vaisseaux sanguins sont présentées. Ces techniques sont utilisées pour transformer un angiogramme en un modèle mathématique avec lequel il est plus facile de travailler pour les analyses subséquentes.

2.3.1 Prétraitement des angiographies

Il y a plusieurs façons d'augmenter le contraste des vaisseaux sanguins au sein d'un angiogramme. Ces méthodes sont utiles puisqu'il n'y a aucune modalité d'imagerie parfaite. Même les angiographies, qui forment leurs images en rehaussant *in situ* le contraste des vaisseaux sanguins, peuvent parfois contenir des structures qui ne sont pas des vaisseaux. Aussi, il y a toujours une certaine quantité de bruit qui s'introduit dans les mesures qui rend difficile la distinction entre vaisseaux et tissus. Il est donc parfois nécessaire de rehausser le contraste des structures tubulaires afin de respecter les hypothèses imposées par les algorithmes de segmentation par rapport aux caractéristiques du volume, ou bien simplement afin de réduire la quantité de bruit segmenté et ainsi faciliter la création du modèle mathématique du réseau vasculaire.

Une première façon de rehausser spécifiquement le contraste des vaisseaux sanguins est de combiner les résultats de plusieurs filtres linéaires appliqués dans différentes directions tridimensionnelles. Par exemple (Tsai et al., 2009) construisent 82 « bâtons » de 11 pixels de longueur qu'ils orientent uniformément sur une demi-sphère, chaque tige étant centrée sur le même voxel et possédant une direction distincte. L'intensité le long d'une tige est additionnée et la valeur maximale obtenue parmi tous les filtres-tiges est choisie comme valeur de *vesselness* $\mathcal{V}(\vec{x})$ pour ce voxel. Le score $\mathcal{V}(\vec{x})$ indique la probabilité qu'un voxel $\vec{x} = (x, y, z)$ fasse partie d'une structure tubulaire. Quelques limitations de cette technique sont : (1) seuls les vaisseaux dont le diamètre est inférieur à la longueur du filtre linéaire peuvent être rehaussés; (2) Nécessite

un grand nombre de calculs pour chaque voxel pour déterminer la métrique de vaisseau (dans le cas de (Tsai et al., 2009), il faut effectuer 82 sommations et trouver un maximum pour chaque voxel d'un volume); (3) Ne fournit pas d'information sur la direction des vaisseaux rehaussés. En contrepartie, l'implémentation de ce genre de filtre est assez simple et permet également de rehausser préférentiellement le centre des vaisseaux.

La catégorie des filtres rehaussant basés sur la matrice Hessienne H permet de résoudre certaines limitations de la méthode précédente. La matrice Hessienne d'un volume 3D $I(\vec{x})$ (où $\vec{x} = (x, y, z)$) est définie comme

$$H = \nabla^2 I(\vec{x}) = \begin{bmatrix} I_{xx}(\vec{x}) & I_{xy}(\vec{x}) & I_{xz}(\vec{x}) \\ I_{yx}(\vec{x}) & I_{yy}(\vec{x}) & I_{yz}(\vec{x}) \\ I_{zx}(\vec{x}) & I_{zy}(\vec{x}) & I_{zz}(\vec{x}) \end{bmatrix}$$

où $I_{ij}(\vec{x}) = \frac{\partial^2 I(\vec{x})}{\partial i \partial j}$ est la dérivée partielle seconde selon les directions i et j . Les valeurs propres de cette matrice sont $\lambda_1(\vec{x}) > \lambda_2(\vec{x}) > \lambda_3(\vec{x})$ et les vecteurs propres associés sont \vec{e}_1, \vec{e}_2 et \vec{e}_3 . (Frangi & Niessen, 1998) ont montré que pour une structure tubulaire 3D parfaite, les valeurs propres de la matrice Hessienne possèdent les caractéristiques suivantes : $|\lambda_1| \approx 0, |\lambda_1| \ll |\lambda_2|$ et $\lambda_2 \approx \lambda_3$. On peut intuitivement retrouver ces résultats en remarquant que les valeurs et vecteurs propres de la matrice Hessienne représentent les composantes principales de la direction de la plus petite courbure de l'intensité du volume en (x, y, z) (ou celle du plus grand rayon de courbure en ce point). Pour un cylindre infini, le plus grand rayon de courbure est dans la même direction que l'axe du cylindre d'où une courbure nulle (d'où $|\lambda_1| \approx 0$). De façon similaire, les deux directions restantes sont dans le plan axial du cylindre, leur courbure est non nulle et inversement proportionnel au rayon local du cylindre. Ainsi, en formant une métrique basée sur les valeurs et vecteurs propres de la matrice Hessienne, il est possible de former une carte 3D de la probabilité de présence d'un vaisseau (aussi appelée *vesselness*). De plus, si on applique cette analyse sur un volume convolué avec un filtre gaussien G de taille σ_f , les vaisseaux dont le rayon est $r \approx \sigma_f$ seront rehaussés préférentiellement. En d'autres mots, il est possible de calculer la matrice H à plusieurs échelles σ_f

$$H_{ij}(\vec{x}, \sigma_f) = \left\{ \frac{\partial^2}{\partial i \partial j} G(\vec{x}, \sigma_f) \right\} * I(\vec{x})$$

En combinant les métriques *vesselness* calculées pour plusieurs σ_f (par exemple en choisissant la valeur maximale pour un point donné), on rehausse simultanément des vaisseaux de rayons différents. Plusieurs métriques ont été développées en se basant sur cette caractéristique de la matrice des dérivées partielles secondes, notamment le filtre de Frangi (Frangi & Niessen, 1998) et le filtre de Sato (Sato et al., 1998). Chaque métrique possède ses avantages et inconvénients (Drechsler & Laura, 2010). Par exemple, la méthode de Frangi a tendance à ne pas rehausser les jonctions entre les vaisseaux, ce qui introduit des trous dans la segmentation de la vasculature à toutes les intersections, alors que la méthode de Sato a de la difficulté à distinguer des vaisseaux parallèles qui apparaissent comme un seul grand vaisseau dans la carte de rehaussement. Également, les deux méthodes peuvent avoir des difficultés à distinguer les structures tubulaires des amas d'intensité ellipsoïdes caractéristiques du bruit (appelés *blobs* en anglais, et décrits par les valeurs propres $\lambda_1 < 0$ et $|\lambda_1| \approx |\lambda_2| \gg 0$). Notons toutefois que l'avantage principal de cette technique basée sur l'analyse de la matrice Hessienne est qu'il est possible d'obtenir en une seule application du filtre la probabilité de présence d'un vaisseau et sa direction tridimensionnelle, alors que les filtres rotatifs conventionnels nécessitent plusieurs passages pour obtenir une information similaire. Aussi, en calculant la matrice Hessienne pour des volumes convolués avec plusieurs tailles de filtre gaussien 3D, on peut rehausser les vaisseaux à plusieurs échelles de rayons simultanément.

Une autre façon de se servir de la matrice Hessienne pour rehausser les vaisseaux sanguins dans une angiographie est de l'utiliser comme tenseur de diffusion anisotrope $D(\vec{x})$. Cette technique, basée sur la théorie des espaces d'échelle (Lindeberg, 1994), fait évoluer les intensités dans un volume à l'aide de l'équation de diffusion $I(\vec{x})_t = \nabla \cdot (D \nabla I(\vec{x}))$ où t est le pas de temps, D le tenseur de diffusion et le volume original est la condition initiale de l'algorithme de diffusion. Cette méthode est entre autres utilisée par (Gooya, Liao, & Sakuma, 2012) pour améliorer l'apparence des vaisseaux sanguins dans un volume IRM préalablement à l'application de leur schéma d'extraction de la vasculature. Ils se basent sur les travaux de (Enquobahrie & Ibanez, 2007; Manniesing, Viergever, & Niessen, 2006) qui définissent un tenseur de diffusion à l'aide de la matrice Hessienne par :

$$D(\vec{x}) \triangleq Q \Lambda' Q^T$$

Où Q contient les vecteurs propres de $H(\vec{x})$ et Λ' est une matrice diagonale définie à l'aide des valeurs de *vesselness* $\mathcal{V}(\vec{x})$ de $H(\vec{x})$ par

$$\lambda'_1 \triangleq 1 + (\omega - 1) \cdot \mathcal{V}^{1/s}$$

$$\lambda'_2 = \lambda'_3 \triangleq 1 + (\epsilon - 1) \cdot \mathcal{V}^{1/s}$$

Où $\omega > \epsilon$, $\epsilon > 0$ et $s \in \mathbb{R}^+$ sont des paramètres contrôlant le comportement de la diffusion des intensités. Ce tenseur favorise la diffusion des intensités dans la direction des vaisseaux sanguins, tout en limitant le mouvement dans le plan axial des vaisseaux. En dehors des structures tubulaires, la mesure de *vesselness* $\mathcal{V}(\vec{x}) \approx 0$ et le tenseur de diffusion devient isotrope, ce qui signifie que la diffusion agit dans toutes les directions de façon similaire. Ainsi, l'intensité dans le tissu s'uniformise et devient floue³, alors que l'intensité dans les vaisseaux sanguins est conservée et leur forme n'est pas modifiée. La carte de rehaussement $\mathcal{V}(\vec{x})$ utilisée peut être obtenue à l'aide d'une analyse multiéchelle et différentes métriques de vaisseaux peuvent être utilisées. Cette technique permet de conserver les parois des structures rehaussées en limitant leur diffusion et atténue les artefacts et les limitations introduits par les mesures de *vesselness* (tels que les trous de jonctions du filtre de Frangi). Toutefois, la diffusion des intensités dans un volume est très lourde du point de vue des ressources informatiques et peut nécessiter un très long temps de calcul. Une façon de contourner ces limitations est par exemple de simuler la diffusion des intensités en parallèle sur carte GPU (N. Wang, Chen, & Feng, 2013).

D'autres méthodes permettant de rehausser le contraste des vaisseaux sanguins existent, telles que l'analyse du flux du gradient des intensités traversant la surface d'une sphère centrée sur un voxel (Law & Chung, 2008). Toutes les méthodes de rehaussement des vaisseaux sont en général utilisées soit pour améliorer la visualisation du réseau vasculaire (à des fins diagnostiques) ou pour réduire la quantité de bruit dans les angiographies avant l'application des méthodes d'extraction des vaisseaux sanguins. Le choix de la méthode de rehaussement dépend des informations requises par l'algorithme de segmentation choisi, par les caractéristiques des volumes à disposition et par le temps de calcul disponible.

³ Une diffusion 3D isotrope des intensités durant t pas de temps est équivalente à la convolution du volume par un filtre gaussien de taille $\sigma_f \propto t$

2.3.2 Méthodes d'extraction des vaisseaux sanguins

Dans la revue de littérature de (Kirbas & Quek, 2004) portant sur les techniques et les algorithmes d'extraction des vaisseaux à partir d'images médicale, les différentes méthodes d'extraction recensées dans la littérature sont classées en 6 catégories : (1) Techniques par reconnaissance de forme; (2) Approches par modèles; (3) Approche par suivi; (4) Approche par intelligence artificielle; (5) Approche par réseau de neurones; et (6) Approche par détection des structures tubulaires. La revue de littérature plus récente de (Lesage, Angelini, Bloch, & Funka-Lea, 2009), en plus de présenter les étapes principales d'un algorithme d'extraction conventionnel, sépare quant à elle les méthodes selon la dimensionnalité du modèle utilisé pour retrouver la structure vasculaire : (1) Approche par croissance de région, (2) Approche par contours actifs, (3) Approche basée sur le suivi de la ligne médiale et (4) les méthodes stochastiques basées sur les filtres de particules et les processus de Markov à points définis⁴. Dans ce mémoire, seules quelques techniques de segmentation sont abordées. La structure typique d'un schéma d'extraction des vaisseaux sanguins est également présentée. Pour un survol plus complet des méthodes d'extraction existantes, consulter les deux revues de littérature mentionnées ci-haut.

Discutons d'abord d'un concept utilisé par plusieurs algorithmes d'extraction, la représentation médiale, qui est un concept géométrique adapté aux problèmes biologiques introduits par (Blum, 1967). Selon cette représentation, un objet est « décrit par un locus à mi-parcours entre [...] deux sections de sa frontière et par la distance [de ce locus] jusqu'à la frontière » (Siddiqi & Pizer, 2008). En d'autres mots, un cylindre infini est décrit à l'aide d'une ligne située en son centre. Chaque point de cette ligne est situé au centre d'une sphère entièrement contenue dans l'objet et dont la surface est bitangente à la surface du cylindre. Le rayon de cette sphère (nommé rayon médial) est associé au point correspondant sur la ligne médiale. Bref, un locus est une courbe 4D formée par la position médiale (x, y, z) et le rayon médial (r) d'un objet. Cette représentation permet de conserver la topologie des objets. Celle-ci peut être obtenue à partir de la surface d'un objet, et l'objet peut-être reconstruit à l'identique à

⁴ Traduction libre de « *Markov Marked Point Processes* »

partir de sa représentation médiale. Ainsi, un réseau de vaisseau sanguin interconnecté est représenté par un réseau de courbes 4D de même topologie. La représentation médiale n'est qu'une seule façon de modéliser les vaisseaux sanguins. D'autres façons consistent à utiliser des surfaces déformables, des superellipsoïdes, des modèles combinant apparence et géométrie. Le choix de la méthode de représentation des vaisseaux sanguins dépend de l'application visée et de la technique d'extraction des vaisseaux utilisée. Comme il sera mentionné dans la section méthodologie, l'approche adoptée dans ce projet est la représentation médiale.

Un algorithme de segmentation de la vasculature typique est séparé en 4 étapes principales (Lesage et al., 2009). Il y a d'abord le prétraitement des données qui permet de préparer les volumes pour que toutes les conditions requises par les algorithmes de segmentation soient respectées. À cette étape, le bruit contenu dans les volumes est réduit, le contraste des vaisseaux sanguins est rehaussé, la taille des volumes peut être ajustée, etc. Les méthodes de rehaussement des vaisseaux sanguins présentées dans la section précédente sont pour la plupart utilisées à cette étape. L'étape suivante est l'initialisation, lors de laquelle les conditions initiales requises par les algorithmes d'extraction sont générées. Ces conditions peuvent être fournies par l'utilisateur (par exemple en indiquant un point à la base de l'arbre vasculaire ou bien un point de départ et un point d'arrivée à relier dans la vasculature). Les conditions initiales peuvent aussi être générées automatiquement à l'aide par exemple d'un seuil d'intensité ou en estimant la distribution d'intensité dans le volume. La troisième étape est le schéma d'extraction des vaisseaux sanguins. L'algorithme permettant de trouver la vasculature dépend du type de condition initiale fournie.

1. Aucune information : Si aucune information n'est fournie à l'algorithme d'extraction, il est possible d'utiliser des méthodes stochastiques pour estimer la position des vaisseaux sanguins. Par exemple, (Lacoste, Finet, & Magnin, 2006) trouvent en premier la position des grands vaisseaux dans une angiographie 2D dont la résolution est réduite numériquement. Ensuite, des vaisseaux supplémentaires sont ajoutés au hasard dans l'arbre vasculaire à l'aide d'un processus de Markov. La densité et la position des vaisseaux est optimisée par recuit simulé intégré dans un algorithme Monte-Carlo à chaînes de Markov à sauts réversibles. Les caractéristiques des nouveaux vaisseaux sont donc basées sur le réseau vasculaire obtenu à l'étape précédente. Ce type d'algorithme peut demander beaucoup de ressources de calcul, en particulier si l'optimisation a lieu dans un espace 3D plutôt que pour une image 2D. Un

avantage de cette technique est qu'elle est indépendante du niveau de bruit et que des contraintes géométriques et topologiques peuvent être facilement imposées lors de l'optimisation de la vasculature.

2. Régions sur- ou sous-segmentées : Si l'information fournie à l'algorithme est une segmentation de la vasculature, mais que les régions fournies contiennent des faux positifs et des faux négatifs, alors des techniques d'évolution de contours peuvent être utilisées. Par exemple (Gooya et al., 2012) déplacent la frontière du masque de la vasculature pour maximiser le flux du gradient d'intensités qui la traverse. Différentes contraintes sont imposées aux processus d'optimisation pour conserver un objet ayant l'apparence d'un vaisseau sanguin et un filtre de diffusion anisotrope est utilisé pour améliorer l'optimisation de la surface des petits vaisseaux. Ce type de technique peut également être utilisé pour optimiser la position des vaisseaux sanguins d'un réseau vasculaire déjà connu. L'optimisation du contour peut toutefois devenir très complexe et nécessiter de longs temps de calcul.
3. Points dans les vaisseaux : Si l'initialisation permet d'obtenir un ensemble de points ou de régions appartenant exclusivement à des vaisseaux (vrais positifs), il est aussi possible d'utiliser des techniques de croissance de région pour retrouver la topologie de la vasculature. À partir de ces points initiaux, la région appartenant aux vaisseaux sanguins croît de façon itérative en ajoutant des voxels voisins à l'aide de critères de sélection. (Lesage et al., 2009) identifie quelques types d'algorithmes de croissance de région, dont la méthode classique basée sur un seuil d'intensité et la propagation d'ondelette (ou d'onde de front) qui encourage la propagation le long des vaisseaux plutôt que dans toutes les directions. Cette méthode est très rapide et simple à implémenter puisqu'elle se base sur des critères de base pour construire la vasculature. Cette simplicité rend toutefois cette technique très sensible au bruit et à la qualité des données et plusieurs stratégies doivent être employées pour s'assurer que la segmentation est fidèle à la vasculature, dont la supervision en temps réel par un utilisateur ou l'adaptation dynamique des critères de sélection des nouveaux voxels.
4. Point à la base de l'arbre vasculaire : Si un point à la base de l'arbre vasculaire est donné par l'utilisation, alors des algorithmes de suivi de la ligne médiale (Friman, Hindennach, Kühnel, & Peitgen, 2010) ou bien un filtre de particule (Allen, Yau, & Noble, 2008) peuvent être

utilisés. Ces méthodes itératives utilisent l'information de l'itération précédente (p. ex. position du vaisseau, diamètre, etc.) pour prédire où se situent et quelles sont les caractéristiques du prochain point de la ligne médiale du vaisseau suivi. La position de ce point est ensuite optimisée puis est utilisée pour prédire la position du prochain point. Les techniques se distinguent par les modèles de propagation utilisés, par les techniques d'optimisation, par le caractère stochastique ou non de l'échantillonnage de la prochaine étape, etc.

5. Points de départ et d'arrivée : Finalement, si l'utilisateur fournit à la fois un point de départ et un point d'arrivée dans l'arbre vasculaire, il est aussi possible d'utiliser des techniques permettant de trouver le chemin le plus court entre 2 points et passant par des vaisseaux, en d'autres termes des techniques d'optimisation du chemin entre 2 points. Une telle méthode est utilisée par (Benmansour & Cohen, 2010). Leur implémentation utilise un modèle de vaisseau combinant ligne médiale et surface, et intègre une métrique basée sur le flux de gradient pour optimiser le parcours des vaisseaux trouvés. Cette approche peut être utile lorsqu'un utilisateur doit interagir manuellement avec une angiographie (par exemple pour trouver rapidement le chemin entre deux vaisseaux ou pour combler des trous dans la vasculature).

La dernière étape qu'on retrouve généralement dans une méthode d'extraction des vaisseaux sanguins est le post-traitement. À ce moment, les résultats fournis par les schémas d'extraction sont nettoyés et des informations supplémentaires sont ajoutées pour décrire la vasculature. Par exemple, si l'algorithme d'extraction fournit comme résultat le contour ou la région représentant la vasculature (bref le masque binaire du vaisseau), alors on peut utiliser des algorithmes de squelettisation pour obtenir sa ligne médiale 1D (Lee, Kashyap, & Chu, 1994). Au contraire, si la méthode de repérage des vaisseaux donne la ligne médiale uniquement (c'est le cas par exemple avec certains filtres de particules), alors le diamètre des vaisseaux peut être estimé par la segmentation des sections axiales, par la propagation de contours, ou par l'optimisation de modèles de cylindres généralisés. D'autres opérations peuvent être effectuées durant le post-traitement pour corriger les erreurs pouvant survenir durant l'extraction des vaisseaux, par exemple des corrections topologiques ou l'effacement de lignes médiales superflues. Pour plus de détails sur le schéma typique d'une méthode de segmentation des vaisseaux sanguins, consulter (Lesage et al., 2009).

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

Cette section décrit les méthodes développées durant ce projet afin d'extraire le réseau vasculaire anatomique contenu dans une angiographie 3D du néocortex. Dans un premier temps, le protocole expérimental à l'origine des données utilisées est présenté. Cette description est suivie de la méthode de segmentation mise en place pour obtenir une première estimation du VAN. Ensuite, l'interface graphique de correction des graphes et les principales méthodes utilisées pour identifier les erreurs de segmentation et pour améliorer la vectorisation des VANs sont présentées.

3.1 Acquisition des données

Notons d'abord que les mesures expérimentales ont été réalisées lors d'un projet précédent par les étudiants Michèle Desjardins et Romain Berti, qui ont complété leur doctorat au sein de ce laboratoire. Les algorithmes développés durant ce projet pour segmenter les vaisseaux sanguins et pour vectoriser le réseau vasculaire utilisent les angiographies acquises à ce moment. Il est donc pertinent de présenter brièvement le protocole expérimental utilisé. Tous les angiogrammes utilisés dans ce projet ont été mesurés sur des rats jeunes et âgés par microscopie à fluorescence 2-photons. Le protocole expérimental utilisé est le suivant.

3.1.1 Préparation des animaux

Les animaux utilisés pour cette étude sont 12 jeunes rats adultes et 12 rats âgés de type *Long-Evans*. L'âge des animaux du premier groupe (noté groupe **J** pour Jeunes) varie entre 11 et 15 semaines, et l'âge de ceux du second groupe (noté groupe **V** pour Vieux) varie entre 23 et 25 mois. En termes de vieillissement humain, ces âges murins correspondent environ à 10 ans pour les jeunes rats (Période de transition puberté/Âge adulte pour le rat) et 60 ans pour les rats âgés (Période postsénescence) (Sengupta, 2013). Il faut noter que la corrélation entre l'âge murin et l'âge humain n'est pas directe puisque les différentes phases de développement du rat ne se font pas au même rythme que chez l'humain. Les rats *Long-Evans* sont tout de même fréquemment utilisés en tant que modèle d'un vieillissement normal. Les rats âgés ont suivi un régime légèrement restreint en calories (20 g/d, Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet) durant leurs 22

premiers mois et ne faisaient pas d'exercice. Tous les rats étaient hébergés dans de grandes cages abritant entre 3 et 4 animaux. Le cycle jour-nuit était de 12-12. Un mois avant les expériences, les rats âgés ont été placés dans des cages individuelles, vivant dans les mêmes conditions que les jeunes rats. Le cycle jour-nuit pour ces cages individuelles était également de 12-12. Toutes les procédures ont été approuvées par le comité d'éthique animale du centre de recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal.

Le jour d'une expérience, un rat est maintenu sous anesthésie à l'isoflurane pour toute la durée des manipulations (entre 8 et 15 heures). À la fin des mesures, l'animal est sacrifié. L'anesthésie est réalisée avec de l'isoflurane à 2.75 % dans de l'oxygène pur avec un débit de 1.5 L/min. Chaque animal reçoit une injection sous-cutanée d'un agent anti-inflammatoire non stéroïdien (*Ketoprofen*, 5 mg/kg poids du corps). Durant l'expérience, le niveau d'isoflurane est maintenu entre 1.5 % et 2 % dans un gaz d'oxygène que l'animal respire librement. Au cours de la chirurgie et de l'acquisition des données, les paramètres physiologiques du rat sont constamment en observation et enregistrés. Ceux-ci sont la respiration, le rythme cardiaque, la pression artérielle et la température. La température de l'animal est maintenue à 37 °C grâce à un coussin à température contrôlable et à boucle de rétroaction (*PhysioSuite*, Kent Scientific, CT, USA). Une sonde et des électrodes sous-cutanées mesurent le rythme respiratoire et l'électrocardiogramme de l'animal. Un cathéter est inséré dans l'artère fémorale pour mesurer la pression sanguine (*Millar*, TX, É.-U.) et un second est inséré dans la veine fémorale pour injecter l'agent de contraste.

L'animal est maintenu immobile à l'aide d'un support stéréotaxique (*WPI*, FL, É.-U.). Une surface d'environ 5 mm x 5 mm de cerveau est exposée en retirant le crâne et la dure-mère au-dessus du cortex sensorimoteur (1-5 mm par rapport au point de Bregma, 1-7 mm à partir de la ligne médiane sur l'axe médial latéral) (Shih et al., 2012). La craniectomie est recouverte par une lamelle de verre (*Coverslip*). Celle-ci est maintenue en place par de l'agarose (1 % dans du liquide cérébro-spinal artificiel; (Nimmerjahn & Helmchen, 2012)). L'agent de contraste est injecté dans la veine fémorale avant d'imager (~150 mg/kg de FITC⁵; 70 kDa, Sigma Aldrich,

⁵ *Fluorescein isothiocyanate-dextran* :

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/46945?lang=fr®ion=CA>

Oakville, Ontario, Canada) à une concentration de 100 mg/mL dans de la saline. Lors des très longues expériences, une dose supplémentaire ($\sim 15\text{-}25\text{ mg}$) est injectée après quelques heures.

3.1.2 Montage du microscope 2-photons

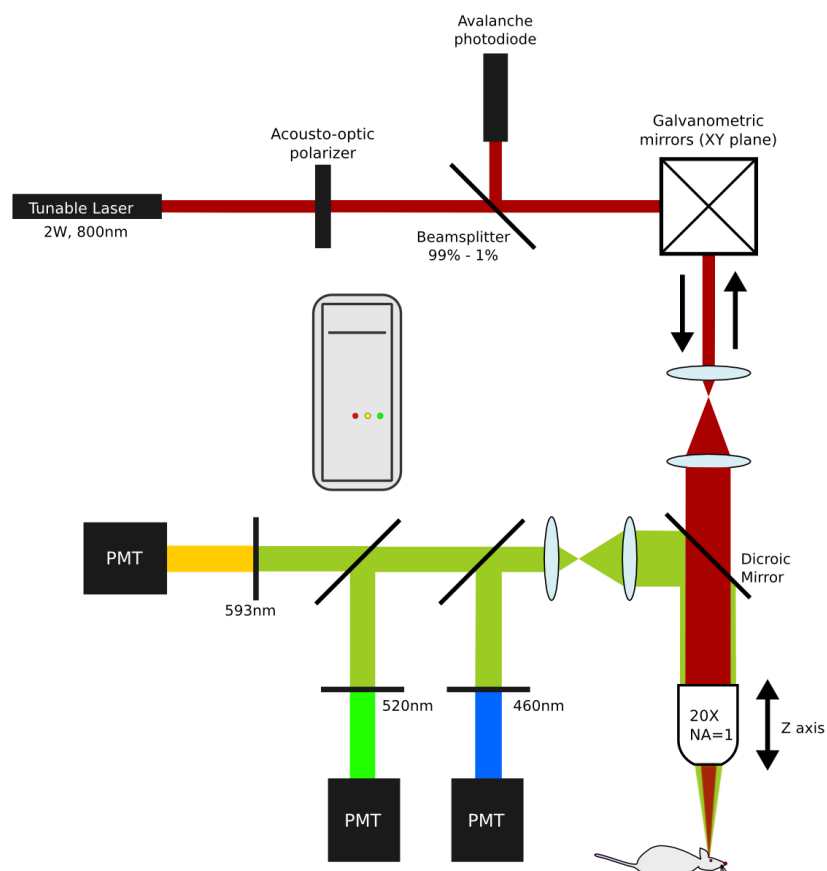


Figure 3.1 Schéma du microscope à fluorescence 2-photons

Les angiographies sont mesurées à l'aide d'un microscope à fluorescence 2-photons assemblé dans le laboratoire par l'ancien étudiant au doctorat Simon Dubeau. Le montage est contrôlé par LabVIEW (*National Instruments, TX, É.-U.*). Un schéma du montage est présenté à la Figure 3.1. Un laser ajustable émet un faisceau d'environ 2 W de puissance vers un polariseur acousto-optique. Ce polariseur est utilisé pour ajuster l'intensité du faisceau en fonction de la profondeur d'excitation. C'est ce qui permet de compenser *in situ* pour l'atténuation de la lumière par la loi de Beer-Lambert. Pour le FITC, la longueur d'onde d'excitation utilisée est 800 nm et la longueur d'onde de fluorescence 2-photons associée à cette énergie d'excitation est d'environ 520 nm. Le faisceau de lumière est balayé en XY au-dessus de l'aire étudiée sur une région de

800x800 μm^2 à l'aide de miroirs galvanométriques. Le faisceau est envoyé vers un objectif 20X ($NA = 1$) par deux lentilles en configuration télescope. L'objectif du microscope focalise la lumière vers une petite région dans l'échantillon, la PSF (pour *Point Spread Function*). La largeur à mi-hauteur théorique de la PSF pour ce montage est de $r_{1/2}=0,19$ micron et $z_{1/2}=0,33$ micron (pour les détails des calculs, consulter (Masters & So, 2008)). Notons que ni l'absorption ni la diffusion par le milieu ne sont considérées dans ce calcul. La lumière émise par fluorescence est collectée par le même objectif. Le faisceau récolté est séparé en 4 branches à l'aide de miroirs dichroïques. Un premier bras optique retourne vers les miroirs galvanométriques. Un séparateur de faisceau 99-1 % dirige ce faisceau vers une photo-diode avalanche qui mesure le signal de réflexion (pour la longueur d'onde 800 nm). Le signal d'absorption est utilisé pour repérer les éléments de la surface. Les autres bras optiques sont dirigés vers un télescope, et chacun traverse un filtre optique passe-bande ($\lambda = 460 \text{ nm}$, 520 nm et 593 nm). La lumière filtrée de chaque branche est détectée par un tube photomultiplicateur. Seule l'angiographie mesurée à la longueur d'onde $\lambda = 520 \text{ nm}$ est utilisée pour segmenter les angiographies, puisque c'est à cette longueur d'onde que le signal de fluorescence est le plus fort. Pour chaque animal, un angiogramme 3D a été acquis. Les angiogrammes sont environs de taille 800 μm x 600 μm x 500 μm . Les tranches 2D XY sont acquises en balayant le faisceau à l'aide des miroirs galvanométriques. Plusieurs tranches 2D de profondeur Z différentes sont mesurées de façon successive en variant la distance entre l'objectif de microscope et la surface du néocortex de l'animal. Les tranches 2D sont séparées de $\Delta Z = 2 \mu\text{m}$.

3.2 Prétraitement des données

La première partie de l'analyse des données consiste en une série de filtres numériques utilisés pour réduire le bruit au sein des angiogrammes, pour augmenter le contraste des vaisseaux sanguins, pour segmenter ceux-ci et trouver une première estimation du graphe représentant le réseau vasculaire contenu dans le volume mesuré. Cette méthode de traitement d'image a été développée dans le cadre de ce projet de maîtrise. Les outils de prétraitement des données sont programmés à l'aide du langage MATLAB R2013a© (*MathWorks, MA, USA*) et de

macros FIJI (Schindelin et al., 2012). FIJI⁶ est une distribution d'ImageJ, un logiciel de traitement d'images libre et gratuit développé en JAVA. Plusieurs méthodes d'analyse d'image publiées dans la littérature scientifique sont disponibles dans ce logiciel, soit dans la distribution de base, soit sous forme de modules d'extension qu'il faut télécharger. L'orchestration de l'analyse et la gestion des calculs pour tous les volumes sont réalisées à l'aide du module MATLAB PSOM⁷ (*Pipeline System for Octave and MATLAB* ; (Bellec et al., 2012)). Le code source de cet outil est maintenu à l'aide de GIT et le dépôt privé est pris en charge sur Bitbucket⁸.

3.2.1 Description de la méthode de segmentation

La méthode de segmentation des vaisseaux sanguins est séparée en 2 principales étapes : (1) La réduction du bruit et le rehaussement du contraste des structures d'intérêt, et (2) la segmentation du réseau vasculaire et le calcul d'une première estimation de son graphe. La Figure 3.2 montre le diagramme du pipeline de traitement développé. La Figure 3.4 représente de façon détaillée l'effet de chaque étape de la méthode de segmentation sur les angiographies. Décrivons en détail chacune des étapes de traitement.

3.2.1.1 Réduction du bruit et rehaussement des structures d'intérêts

D'abord, un rééchantillonnage est effectué pour obtenir des voxels isotropes, c'est-à-dire dont chaque direction (x, y, z) est de même taille. Cette opération est nécessaire, car plusieurs filtres posent l'hypothèse que la taille ou la résolution du volume est la même dans toutes les directions. Ceci simplifie également la programmation des filtres subséquents. Le rééchantillonnage est réalisé pour chaque volume à l'aide du module Fiji « *Scale* » et d'un fichier macro généré par un script MATLAB. La méthode d'interpolation utilisée est bicubique. La plus petite dimension d'un voxel est utilisée pour rééchantillonner les 2 autres directions. Par exemple, si le balayage du microscope a pris des mesures distantes de $\Delta x = 1.5 \mu m$, $\Delta y = 1 \mu m$ et $\Delta z = 2 \mu m$, alors $s = \Delta y$ est utilisé comme gabarit de rééchantillonnage. Les dimensions du volume en X et

⁶ <http://fiji.sc>

⁷ <http://code.google.com/p/psom>

⁸ https://joel_lefebvre@bitbucket.org/joel_lefebvre/asagrav.git

en Z seront modifiées pour que les nouveaux voxels interpolés selon ces directions soient distants de $s = 1 \mu m$. On obtient ainsi une grille 3D de mesures d'intensité également espacées.

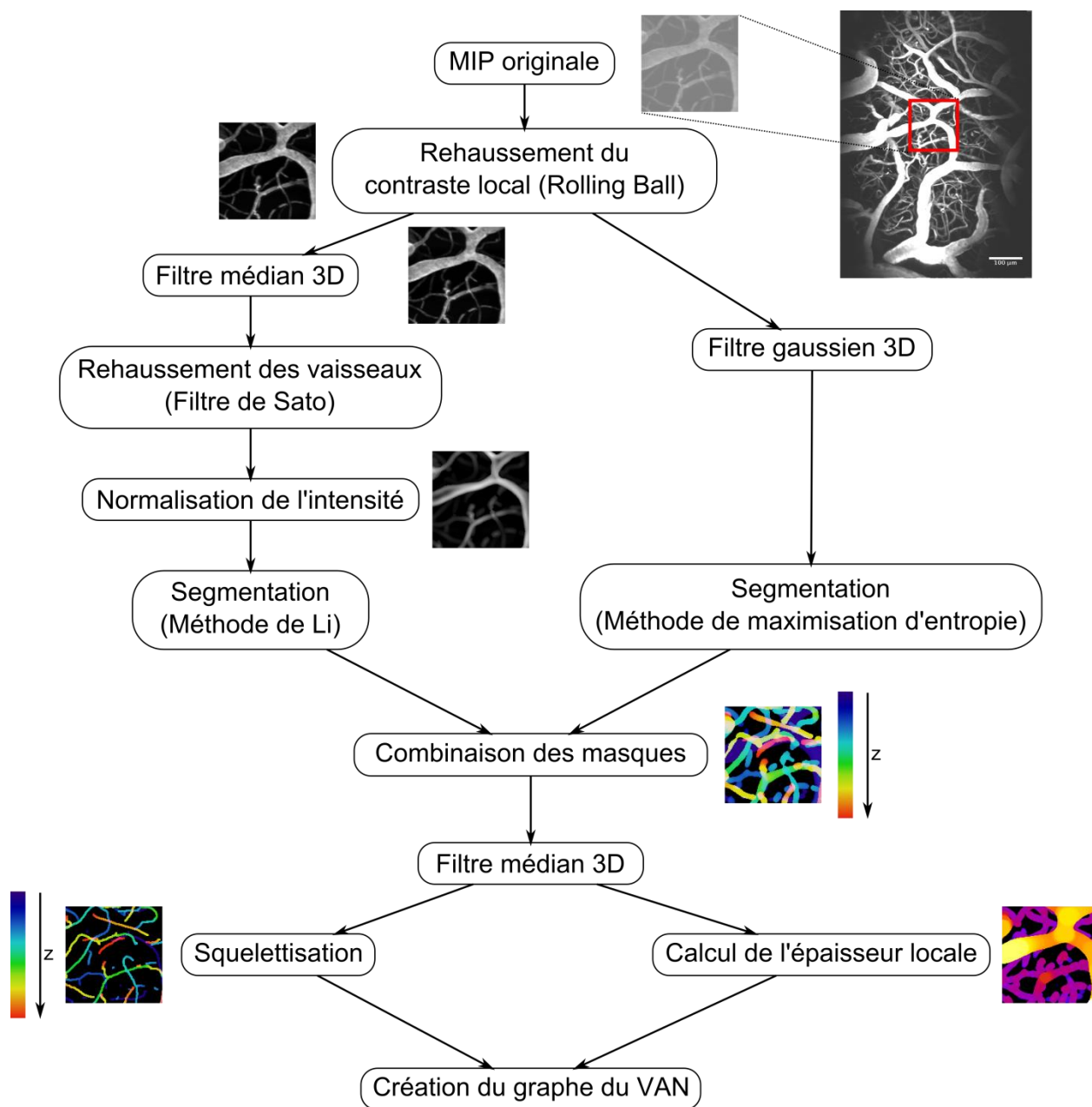


Figure 3.2 Diagramme du pipeline de prétraitement des angiographies

Une seconde étape vise à corriger le volume pour un décalage non linéaire des positions de mesures introduit par le balayage des miroirs galvanométriques. La fréquence de balayage des miroirs est très élevée afin de pouvoir acquérir un volume entier rapidement. Or, à chaque fin de

ligne, les miroirs doivent changer de direction pour parcourir la ligne suivante. Ceci entraîne une décélération puis une accélération apparente qui sont du même ordre de grandeur que la vitesse de balayage, de sorte que les positions réelles des mesures ne sont pas exactement celles attendues. De plus, ces profils d'accélération ne sont pas linéaires, et sont différents selon la direction parcourue par les miroirs. Ce phénomène introduit un décalage de position des structures entre les lignes paires et impaires, qui sont balayées dans des directions différentes. Une façon simple de corriger cet effet est en effectuant une translation rigide des lignes paires par rapport aux lignes impaires. Ceci est réalisé à l'aide d'un outil graphique développé dans MATLAB, qui permet d'estimer visuellement la translation nécessaire pour chaque volume.

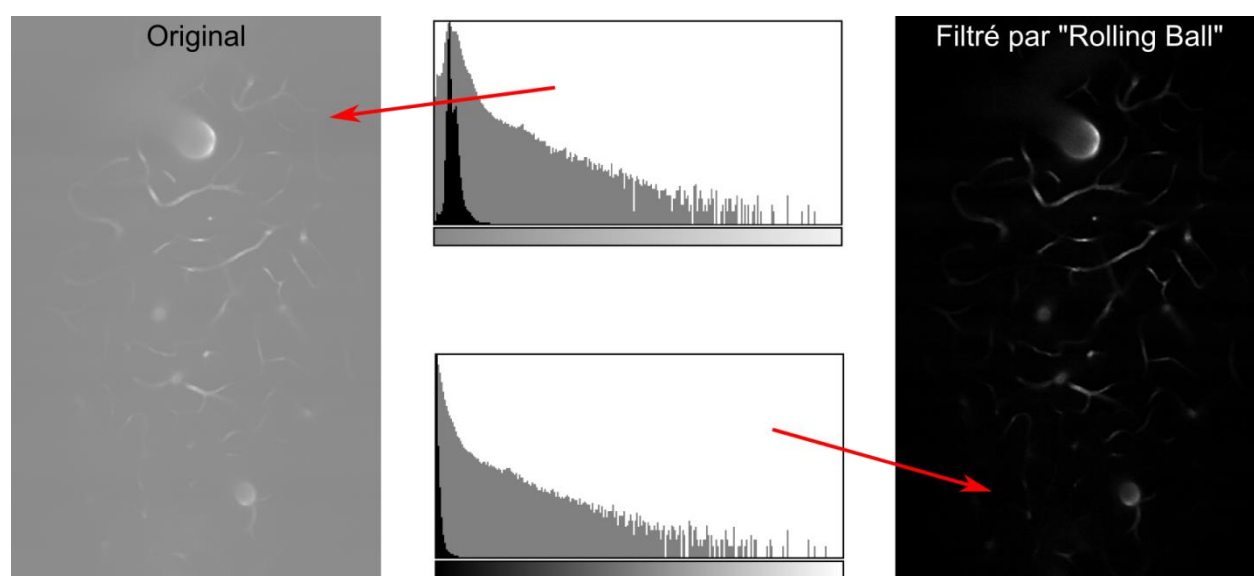


Figure 3.3 Effet de l'algorithme « Rolling Ball » sur l'historgramme (gauche : Original, droit : Sans arrière-plan, centre: histogramme en noir, log(histogramme) en gris)

Le profil d'intensité pour chaque tranche est formé de 2 groupes de voxels (Figure 3.3). Un premier contient un très grand nombre de voxels de faible intensité et de faible variance. Ce groupe correspond à l'arrière-plan. L'intensité des voxels qu'il contient, bien que faible, n'est pas tout à fait nulle. Ceci est dû à la méthode d'encodage des mesures de tensions des PMTs, à la nature discrète du signal mesuré qui suit une distribution de Poisson et au bruit thermique du détecteur. Le second groupe, associé au contraste dans les vaisseaux sanguins, contient beaucoup moins de voxels, leur intensité est élevée et possède une grande variance. Le problème est d'une part que l'arrière-plan n'est pas tout à fait nul, et d'autre part qu'il y a parfois superposition des pixels d'arrière-plan et d'avant-plan dans l'historgramme. Ceci rend plus difficile la détermination

d'un seuil d'intensité robuste face au bruit, et limite les possibilités de visualisation. On cherche donc à uniformiser l'arrière-plan en utilisant l'algorithme « *Rolling Ball* » de FIJI. Cette méthode est appliquée à l'aide d'un fichier macro généré par un script MATLAB pour chaque volume. La taille de l'élément est de 50 microns. Cette technique permet en quelque sorte d'améliorer le contraste localement et tranche par tranche.

Ce volume, dont le contraste local a été amélioré, est utilisé de 2 façons comme on peut l'observer sur le diagramme du pipeline de traitement. Dans le premier cas, un filtre médian 3D est appliqué dont le rayon du noyau de convolution est de $r = 1$ [pixel]. Ceci permet de réduire la quantité de bruit de Poisson et améliore les performances du filtre rehaussant suivant. Ensuite, ce volume filtré est utilisé par un filtre de Sato (Sato et al., 1998), qui permet de rehausser les vaisseaux sanguins en analysant en tout point du volume les valeurs propres et vecteurs propres de la matrice Hessienne de l'intensité. Les mesures de rehaussement à chaque échelle ($s = 10-14$ microns, 5 échelles) sont combinées en sélectionnant la valeur maximale pour chaque pixel. Les échelles utilisées ont été déterminées suite à une optimisation qualitative. Ensuite, le volume des mesures de similarité avec des vaisseaux est normalisé, en utilisant l'histogramme de l'ensemble du volume et en ne saturant aucun voxel. Ces filtres sont appliqués dans FIJI à l'aide de fichiers macro générés par des scripts MATLAB.

La dernière étape de rehaussement et de réduction du bruit consiste à appliquer un filtre gaussien tridimensionnel, avec un noyau de convolution de rayon $r = 5$ microns, sur le volume dont le contraste local a été amélioré. Ce lissage des intensités dans toutes les directions permet de réduire grandement l'effet du bruit sur la segmentation qui est appliquée dans la seconde étape de traitement. L'utilisation d'un grand noyau de convolution permet également de s'affranchir des petits objets dans le volume et des textures à la surface des vaisseaux sanguins qui rendent difficile la création du modèle du VAN, comme il sera discuté plus loin.

Pour résumer, à la fin de la première étape de traitement d'image, deux volumes sont obtenus. Le premier contient le résultat d'un filtre de Sato à multiéchelle. Le second est le volume original lissé dans toutes les directions. Chacun est utilisé lors de la segmentation du réseau vasculaire. Décrivons maintenant la façon dont la première estimation du graphe du réseau vasculaire est obtenue.

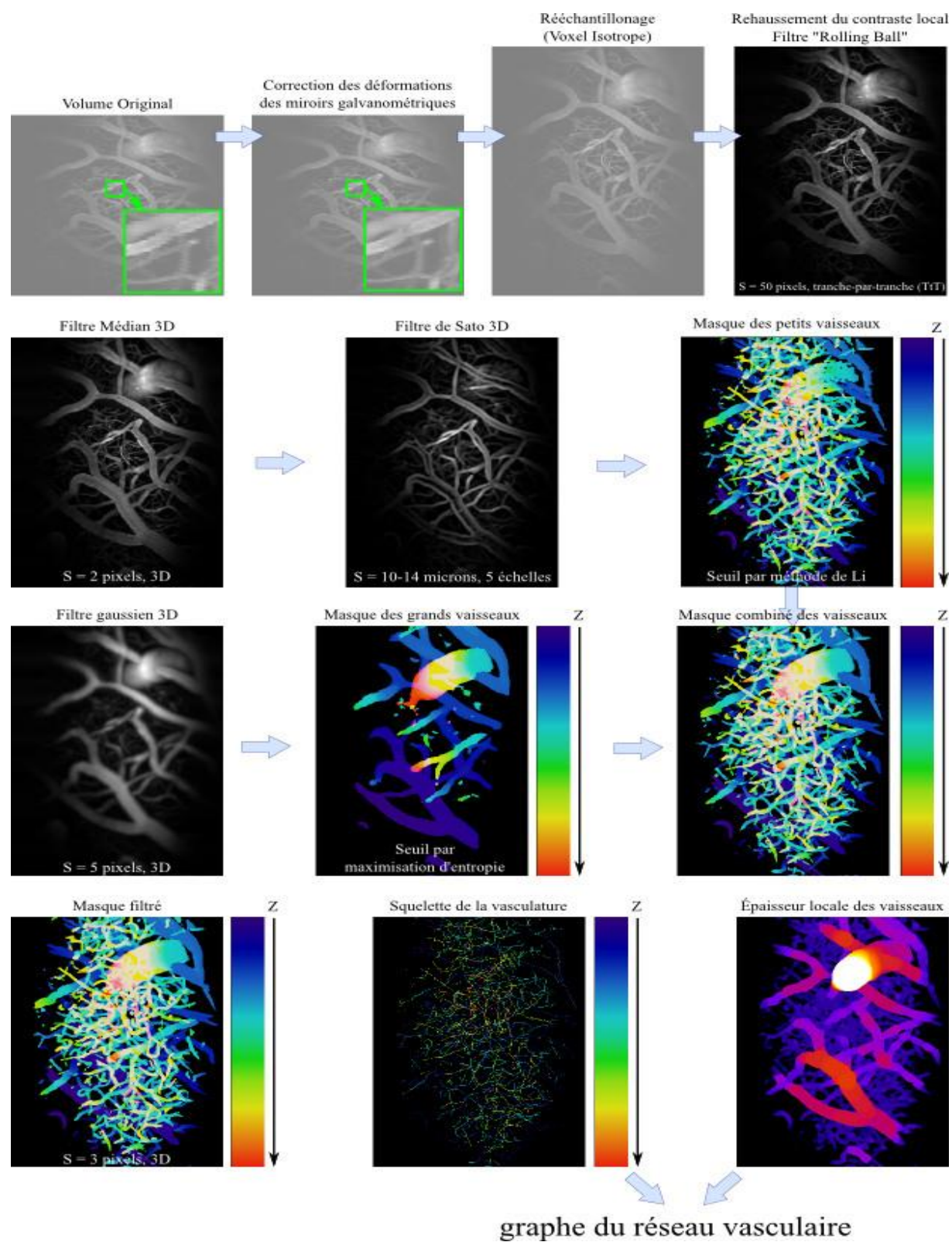


Figure 3.4 : Représentation détaillée de chaque étape de la méthode de segmentation. $S = x$ désigne le rayon du noyau de convolution utilisé

3.2.1.2 Segmentation du VAN et calcul de son graphe

Les deux volumes rehaussés obtenus à l'étape précédente sont utilisés de façon différente pour former un masque binaire de la vasculature au sein du volume. D'abord, l'angiographie contenant les mesures de rehaussement multiéchelle des vaisseaux sanguins est utilisée pour segmenter les petits objets, comme les capillaires et les vaisseaux de faible diamètre. La segmentation de ce volume est réalisée en choisissant un seuil d'intensité pour l'ensemble du volume à l'aide de la méthode de Li (Li & Tam, 1998). Cette méthode cherche à minimiser la distance théorique de l'information (Divergence de Kullback-Leibler) entre l'image segmentée et l'image originale, sous la contrainte que l'intensité moyenne de l'avant-plan et de l'arrière-plan soient les mêmes pour l'image originale et l'image segmentée (Chen & Leung, 2004). Cette méthode est utilisée, car on désire segmenter le plus grand nombre de capillaires possibles, leur intensité variant grandement dans le volume rehaussé. Le bruit rehaussé dans ce volume est de faible intensité. En utilisant la méthode de Li pour déterminer le seuil, on arrive à segmenter un plus grand nombre de vaisseaux et à confiner la plupart du bruit dans l'arrière-plan.

Le second volume sert quant à lui à segmenter les structures plus imposantes, comme les artérioles et veinules à la surface du cortex ainsi que les artérioles plongeantes. Ce volume contient l'angiographie originale pour laquelle le contraste local a été augmenté et dont les structures fines ont été lissées par un filtre gaussien 3D à grand noyau. L'application du filtre gaussien permet de réduire la rugosité des surfaces segmentées et son effet diffusant permet de ne segmenter que les grands objets. En effet, le filtre gaussien agit comme un diffuseur spatial isotrope d'intensité de sorte que l'intensité des petits vaisseaux se mélange avec celle de l'arrière-plan. L'intensité à l'intérieur des grands vaisseaux s'uniformise, et la diffusion entraîne le lissage de leurs parois. Ce volume est segmenté en déterminant un seuil d'intensité tranche par tranche à l'aide de la méthode de maximisation de l'entropie de l'image segmentée (Kapur, Sahoo, & Wong, 1985). Cette méthode de seuillage considère qu'une image est formée par deux distributions distinctes de signal, et cherche donc à maximiser la somme de l'entropie (ou quantité d'information) de chaque groupe. Le calcul du seuil pour chaque tranche permet de diminuer l'effet de l'atténuation du signal par la loi de Beer-Lambert.

On utilise les méthodes de Li et de maximisation de l'entropie pour déterminer le seuil d'intensité afin d'automatiser la formation du graphe du réseau vasculaire et pour rendre la méthode plus robuste face à la variabilité des mesures qu'on peut rencontrer lorsqu'on travaille avec des données expérimentales. Les deux volumes segmentés, l'un contenant majoritairement les capillaires et les petits vaisseaux et l'autre les plus grands objets, sont ensuite combinés en un seul volume. Ce masque du réseau vasculaire est finalement filtré à l'aide d'un noyau médian 3D de rayon $r=3$ pixels. Ce filtre diminue la quantité de bruit segmenté (en particulier le bruit de Poisson), permet de combler quelques trous dans les objets binaires et atténue la rugosité de leur surface. Toutes ces opérations sont utiles pour améliorer le calcul du graphe à partir du réseau vasculaire segmenté. Notons que tous les filtres et méthodes de segmentation mentionnés dans cette section sont appliqués dans le logiciel FIJI à l'aide de macros générés par des scripts MATLAB.

Le graphe du réseau vasculaire anatomique est calculé à partir du masque binaire de la vasculature en utilisant un algorithme de squelettisation. Cette méthode permet d'obtenir la ligne médiale d'un objet à l'aide d'opération de morphologie mathématique, et sa topologie est conservée en vérifiant les opérations réalisées à l'aide d'une table d'Euler. L'algorithme utilisé pour effectuer la squelettisation est le module FIJI « *Skeletonize 3D* »⁹ et est basé sur les travaux de (Lee et al., 1994). Le squelette obtenu consiste en une collection de lignes minces interconnectées et formées de voxels adjacents selon la définition d'un voisinage N_{26} , c'est-à-dire que deux voxels sont considérés voisins s'ils ont au moins une face, une arête ou un sommet en commun (Figure 3.5a). Chaque ligne du squelette a une épaisseur d'un seul voxel.

⁹ <http://fiji.sc/Skeletonize3D>

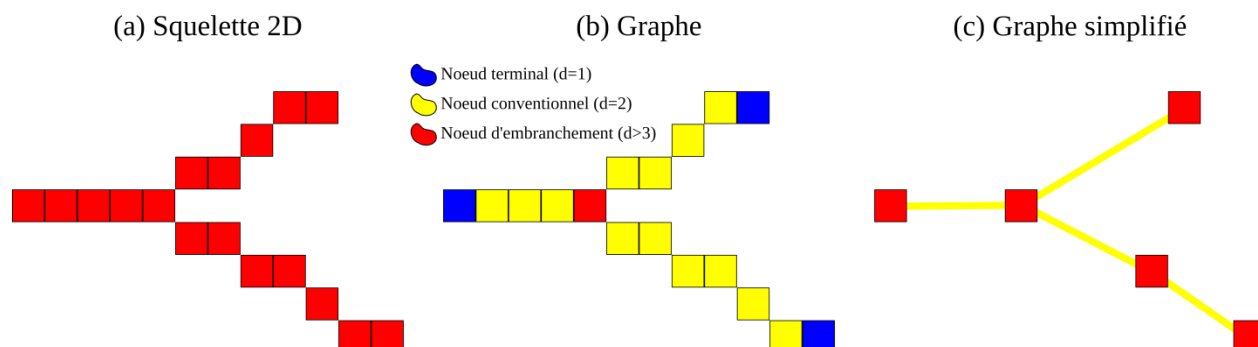


Figure 3.5 Représentation schématique de la transformation du squelette en graphe. (a) Squelette issu de l'amincissement morphologique du masque binaire du VAN. (b) Graphe intermédiaire à densité de nœuds élevée. Le code de couleur désigne la catégorie du nœud. (c) Graphe simplifié à densité de nœuds faible, utilisé pour la correction manuelle, l'analyse et la modélisation. Un nœud d'ordre 2 a été ajouté sur une branche pour respecter la densité spatiale de nœuds.

La dernière étape de prétraitement consiste à transformer cette représentation en squelette par un graphe. Pour ce faire, chaque voxel du squelette est parcouru et son nombre de voisins N_{26} est déterminé. Le voxel est classé comme (1) nœud terminal s'il n'a qu'un seul voisin, (2) nœud conventionnel s'il en a 2, et (3) nœud d'embranchement s'il a 3 voisins ou plus. Tous les nœuds repérés sont ajoutés dans une liste. Ensuite, une liste de liens est créée, décrivant tous les liens entre des nœuds adjacents. Chaque élément de cette liste contient 2 informations, soit l'identifiant du nœud d'origine et du nœud de destination. On obtient ainsi une représentation du réseau vasculaire anatomique par un graphe non orienté formé de nœuds et de lien entre ces nœuds. Dans ce modèle, un vaisseau sanguin consiste en tous les nœuds de degré 2 séparant deux nœuds de degré 3. Les vaisseaux terminaux, c'est-à-dire ceux qui sortent du volume de l'angiographie, sont formés d'une série de nœuds de degré 2 séparant un nœud d'ordre 3 et un deuxième d'ordre 1. Tous les vaisseaux qui sont connectés à un même réseau forment un groupe (aussi nommé composante connexe en théorie des graphes). Il peut exister plusieurs groupes dans une même angiographie tout dépendant de la qualité des mesures, des performances de la méthode de segmentation et des caractéristiques de la microvasculature observée. Par construction du système cardiovasculaire, on s'attend tout de même à n'obtenir qu'un seul groupe dans l'angiographie, c'est-à-dire que tous les vaisseaux observés sont interconnectés.

La densité spatiale de nœud de ce graphe est très élevée puisque tous les voxels du squelette original ont été transformés en nœuds et que chaque voisinage est représenté par un lien. Cette grande quantité d'information rend plus lents les calculs et les interactions manuelles qui doivent être effectuées afin de corriger les erreurs de segmentation. Pour résoudre ce problème, la densité linéaire de nœud est réduite pour chaque vaisseau (Figure 3.5c), de sorte que la distance spatiale moyenne entre tous les nœuds du graphe devient de $d \approx 5$ voxels. Tous les nœuds d'embranchements ou les nœuds terminaux sont conservés, seuls les nœuds de degrés 2 sont modifiés, ainsi la topologie du réseau est conservée.

À chaque nœud sont associés une position spatiale 3D et un diamètre. Le diamètre est déterminé en estimant l'épaisseur locale du masque binaire de la vasculature. L'épaisseur locale d'un objet est définie comme étant la sphère de rayon maximale entièrement incluse dans cet objet et pouvant être centrée sur un point de son squelette. Pour calculer cette épaisseur, l'algorithme développé par (Hildebrand & Rüeggsegger, 1997) est utilisé. Cette méthode est implémentée dans FIJI par le module « *Local Thickness* » et elle est appliquée au masque du VAN à l'aide de fichier macro généré par des scripts MATLAB. La carte d'épaisseur locale est utilisée pour associer un diamètre à chaque nœud du graphe du réseau vasculaire. Ce modèle mathématique permet la reconstruction d'un réseau vasculaire synthétique en 3D. En effet, il suffit d'effectuer la convolution spatiale du graphe par une sphère de rayon variable (Figure 3.6). Cette reconstruction peut être utilisée pour simuler le débit du sang et la diffusion de l'oxygène dans l'angiographie, et pour simuler le signal BOLD que ce volume génère. Elle est également utilisée à des fins de visualisation lors de la correction manuelle du graphe.

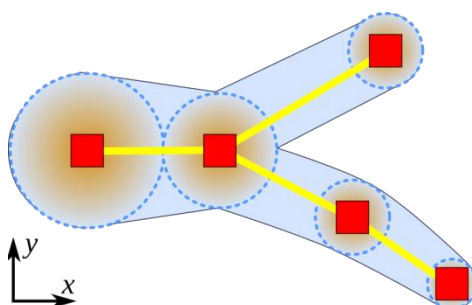


Figure 3.6 Représentation 2D de la reconstruction du réseau vasculaire à partir du graphe du VAN.

Ce modèle de la vasculature est obtenu en convoluant une sphère, dont le diamètre suit celui des nœuds, le long des vaisseaux.

Finalement, notons que pour certains volumes, les paramètres devaient être ajustés manuellement pour améliorer les performances des algorithmes de segmentation ou afin de palier à des sources de variabilités qui ne sont pas considérées par la méthode mise en place. Notons par exemple l'instabilité mécanique du montage qui cause des répétitions dans les données pour certaines expériences (capillaires dédoublés en Z), l'ajustement manuel du gain du détecteur qui entraîne des variations rapides d'intensité d'une tranche à l'autre pour un même objet, ou bien la présence plus ou moins importante de régions saturées en intensité à la surface des angiographies. Mentionnons pour terminer que chaque graphe est enregistré dans un fichier *.mat* sous forme d'une structure. Ceci permet de séparer l'angiographie de son graphe et rend possible les modifications du réseau vasculaire ou son analyse sans avoir à utiliser le volume acquis.

3.3 Correction manuelle des réseaux vasculaires

La méthode développée plus haut permet de tracer adéquatement une grande quantité des vaisseaux présents dans les angiographies. Malgré ces performances, il demeure toujours une certaine quantité de bruit affectant les données et qui résulte en des erreurs de segmentation. Ces erreurs de segmentation (que ce soit au niveau de la quantité de bruit segmenté ou en raison des trous dans le masque de la vasculature) entraînent la création d'un graphe partiellement erroné. Les différents types d'erreurs rencontrées sont présentés dans la sous-section suivante. Ensuite, il est question de l'outil d'interaction manuel qui a été développé pour corriger les graphes à la main. Ceci est suivi d'une brève présentation des procédures de nettoyage réalisées avec l'outil développé durant ce projet et qui sont utilisées pour nettoyer les graphes.

3.3.1 Types d'erreurs de segmentation

Les erreurs de segmentation observées peuvent être séparées en 3 catégories selon leurs effets sur le modèle de graphe du réseau vasculaire : (1) Vaisseaux manquants, (2) Vaisseaux superflus et (3) Vaisseaux erronés. Ces trois types d'erreurs imposent des contraintes sur les fonctionnalités devant être présentes dans l'interface de correction manuelle du graphe

développée. La Figure 3.7 présente quelques exemples d'erreurs de segmentation et leur correction à l'aide de l'interface graphique développée.

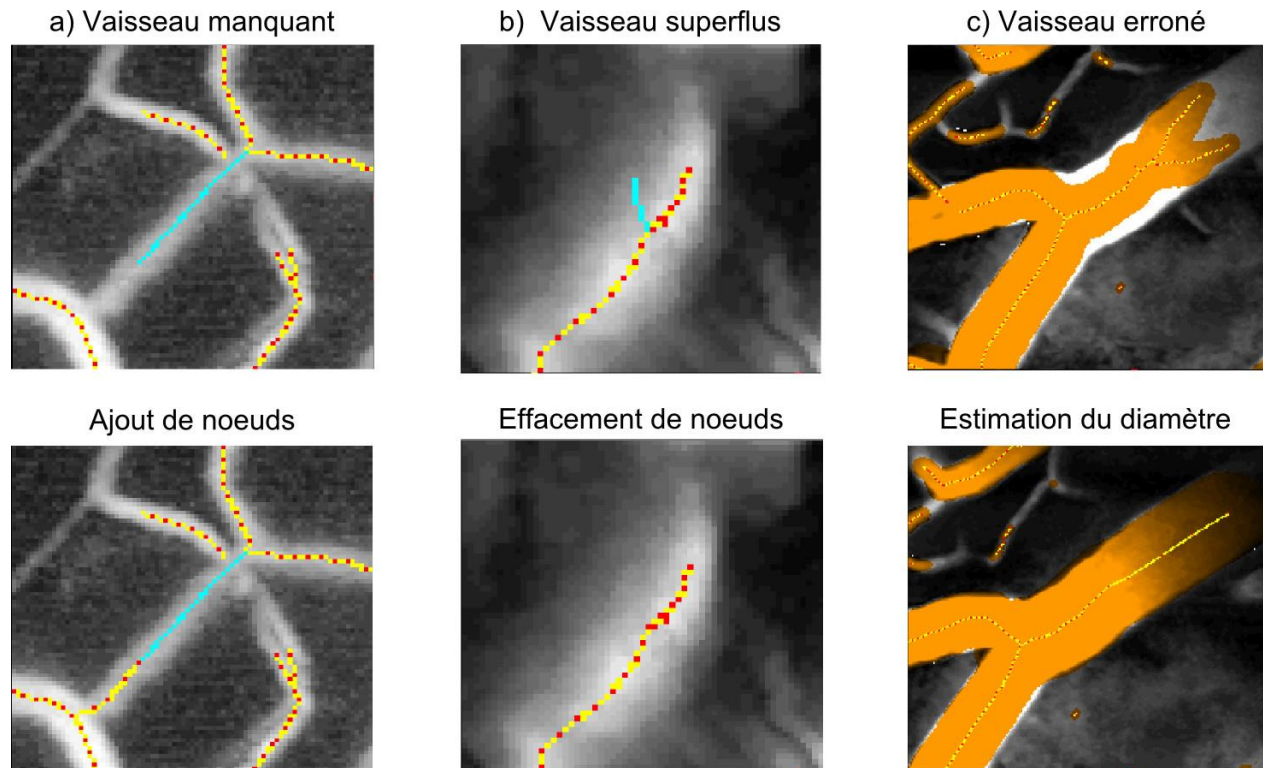


Figure 3.7 Exemples d'erreurs de segmentation et leur correction à l'aide du GUI

3.3.1.1 Type d'erreur 1 : Vaisseaux manquants

Ce type d'erreur est provoqué par l'absence de structures vasculaires dans le masque de l'angiographie, ou par l'aspect fragmenté que peuvent prendre certains vaisseaux lorsque le SNR est faible. Quelques causes entraînant la disparition de ces vaisseaux sont :

1. Un ratio signal-sur-bruit (SNR) faible dans certaines régions dû au profil de l'objectif du microscope qui capte moins de photons provenant de grands angles (pourtour du volume), à l'atténuation de Beer-Lambert du signal avec la profondeur et à l'ombrage sous les grands vaisseaux qui rend difficilement visible les capillaires en dessous.

2. La présence de globules rouges dans les capillaires, qui crée des zones sombres dans ces vaisseaux, ou même parfois la perte complète de leur contraste lorsque le diamètre du capillaire est du même ordre de grandeur que celui des globules rouges (soit de 6 à 8 microns). En effet, l'agent de contraste est en solution dans le plasma du sang. Lorsque l'hématocrite est élevé, la quantité de plasma diminue par rapport au volume total du sang, donc la quantité d'agents de contraste. De plus, dans les capillaires les globules rouges se déplacent un à la suite de l'autre, ce qui introduit des régions successives dans lesquelles il n'y a pratiquement pas de fluorophore et qui n'apparaissent pas dans l'angiographie.
3. La saturation des détecteurs après les grands vaisseaux à haut contraste peut prendre un certain temps pour revenir à un état normal. La vitesse de balayage des miroirs galvanométriques n'est toutefois pas ajustée pour tenir compte de ce temps de récupération des détecteurs. Ceci a deux effets : (1) les parois de ces artérioles et veinules prennent un aspect diffus et (2) les petits vaisseaux qui se retrouvent dans la région de transition affichent un contraste plus faible par rapport à l'arrière-plan semi-saturé.

Ces différentes sources de variation du SNR affectent les performances de l'algorithme de segmentation utilisé, qui détermine un seuil d'intensité à partir de l'analyse de l'histogramme des intensités du volume ou d'une tranche. Les régions de plus faible SNR sont considérées comme étant l'arrière-plan par cet algorithme, d'où l'introduction de trous dans le masque de la vasculature. Ces erreurs de segmentation se traduisent dans le graphe du VAN par des trous, par une grande quantité de segments terminaux, par des vaisseaux manquants et parfois par des régions complètes n'ayant pas été tracées (surtout en périphérie du volume et en profondeur). Au lieu de n'obtenir qu'un seul groupe de vaisseaux interconnectés (composante connexe) comme on s'attend étant donné la nature de la vasculature, on obtient plusieurs réseaux vasculaires séparés pour une même angiographie. L'outil d'interaction manuelle doit donc permettre de détecter les régions manquantes et les vaisseaux qui n'ont pas été inclus dans le graphe. Il doit également permettre de les tracer, soit à la main, soit en utilisant un algorithme de propagation de nœuds.

3.3.1.2 Type d'erreur 2 : Vaisseaux superflus

Ces erreurs ne sont pas dues à la disparition de vaisseaux dans le masque de la vasculature, mais plutôt à la segmentation de bruit, à l'apparition de détails et d'objets non significatifs qui

introduisent des nœuds et segments inutiles dans le graphe du VAN. L'apparition de vaisseaux superflus a également plusieurs causes possibles.

1. La texture à la surface des vaisseaux éloigne l'apparence du masque de la vasculature de celle, lisse et dépourvue de trous, du cas idéal (Figure 3.8). En effet, l'amincissement morphologique pour obtenir le squelette du VAN tente de conserver la texture de la surface des vaisseaux. Alors qu'un vaisseau lisse est représenté par une seule ligne médiale, un vaisseau possédant une surface rugueuse sera représenté à l'aide d'une ligne médiale et de quelques petits segments supplémentaires permettant de décrire les variations principales de la paroi vasculaire. Ces segments supplémentaires doivent être retirés lors du post-traitement parce qu'ils ne représentent pas véritablement un vaisseau sanguin. De façon similaire, l'aspect géométrique des vaisseaux introduit des variations dans le graphe qui ne sont pas nécessaires pour la description du VAN. En effet, le modèle pose l'hypothèse que les vaisseaux sont de forme cylindrique et que leur diamètre est le même dans toutes les directions radiales. Or ce n'est pas le cas en réalité, et le squelette ajuste ses branches en conséquence. Bien que les informations fines sur la forme de la paroi vasculaire puissent être utiles pour certaines applications, elles ne sont pas nécessaires pour l'étude du réseau vasculaire. Il faut donc retirer les segments non significatifs du graphe afin d'obtenir un modèle vasculaire simplifié, pour lequel chaque segment représente un vaisseau et chaque nœud d'ordre 3 ou plus est un embranchement reliant des vaisseaux sanguins.

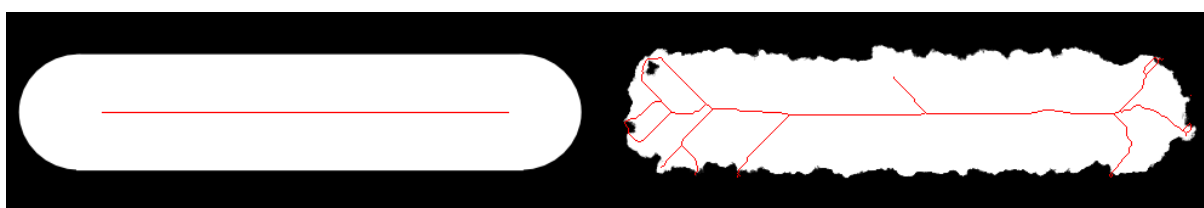


Figure 3.8 Effet de la texture de la paroi vasculaire sur le squelette. Un vaisseau à paroi lisse (gauche) résulte en un seul segment rectiligne, alors qu'un vaisseau à paroi bruitée (droite) possède un squelette avec plusieurs segments supplémentaires pour conserver les caractéristiques principales de la surface.

2. La présence de bruit segmenté ajoute aussi plusieurs nœuds et liens dans le graphe qui ne sont pas significatifs et qui doivent être effacés en post-traitement. Ce bruit segmenté peut

provenir de régions pour lesquelles le SNR est faible, c'est-à-dire pour lesquelles l'intensité du bruit est similaire à celle du signal. Aussi, certaines zones pour lesquelles l'intensité est saturée ou très élevée peuvent être segmentées alors qu'elles ne sont pas des vaisseaux sanguins. Par exemple, la présence de saignement, la saturation du détecteur causée par un gain électronique mal ajusté ou bien une forte réflexion de la lumière par la surface du cortex sont quelques facteurs qui entraînent de fortes intensités mesurées et la présence de grande région segmentées.

3. Lorsque les vaisseaux sont rapprochés les uns des autres, il est parfois difficile de bien voir s'ils sont séparés. Suite à la segmentation de la vasculature, tous les vaisseaux pour lesquels au moins un voxel est dans le voisinage N_{26} d'un autre sont considérés comme un seul objet. Les contraintes de conservation de la topologie de l'algorithme de squelettisation ont donc pour conséquences que certains vaisseaux rapprochés se retrouvent connectés dans le graphe alors qu'ils devraient être séparés. Ces segments faisant le pont entre deux vaisseaux non connectés doivent être repérés et enlevés.

Ces différentes sources d'erreurs entraînent l'apparition de petits segments terminaux non significatifs, de mauvaises connexions entre des vaisseaux et d'une multitude de petits segments et groupes de segments superflus. Il est donc nécessaire que l'outil développé puisse repérer ces segments erronés et les distinguer des vaisseaux véritables. L'interface doit également permettre d'effacer ces vaisseaux superflus rapidement.

3.3.1.3 Type d'erreur 3 : Vaisseaux erronés

Un dernier type d'erreur touche les vaisseaux qui ont été bien repérés par la méthode d'extraction, mais qui contiennent des erreurs de position ou de diamètre. Par exemple, le contraste le long d'une artériole peut varier grandement, en particulier lorsqu'elle plonge dans le volume. Sa direction est alors la même que la direction du parcours de la lumière sortant du microscope, de sorte que le faisceau laser est atténué beaucoup plus rapidement que s'il parcourait la même distance dans les tissus. Le contraste au sommet d'une artériole diminue rapidement avec la profondeur. Ceci se manifeste par une variation de l'épaisseur locale du masque de ce vaisseau le long de son axe longitudinal et l'atténuation accentuée du centre de ces vaisseaux par rapport aux parois ou aux surfaces courbes. Le diamètre du vaisseau peut alors

varier d'un nœud à l'autre, ou bien apparaître très mince là où le contraste est faible et plus large ailleurs. Concernant les erreurs de positionnement, une cause possible est le mouvement du montage optique lors d'un balayage, qui peut causer des mesures répétées d'un plan à l'autre en Z dans le pire des cas. On obtient alors des segments dédoublés, et il faut pouvoir les repérer et choisir quel vaisseau conservé et quel autre retirer du VAN. Une seconde cause des erreurs de positionnement est l'apparition d'artefacts liés aux filtres de rehaussement utilisés. Par exemple, le filtre de rehaussement de Sato augmente aussi le contraste des amas d'intensité de forme ellipsoïde, les parois des grands vaisseaux et parfois l'ombre sous les vaisseaux à fort contraste. Ces régions sont toutes à proximité de vrais vaisseaux, et modifient donc le parcours du segment les représentant dans le graphe du VAN. La méthode de correction doit donc permettre de faire des ajustements de positions de vaisseaux, de visualiser et de corriger leur diamètre. Elle doit également permettre de bien visualiser la structure 3D des vaisseaux afin de mieux repérer et distinguer les types d'erreurs mentionnés plus haut.

3.3.2 Description de l'interface de correction manuelle

L'interface de correction manuelle du graphe est présentée à la Figure 3.10. Elle a été développée en utilisant le langage MATLAB et son éditeur d'interface intégré GUIDE. Certaines fonctionnalités utilisent FIJI par l'entremise de fichiers macros. Quelques méthodes utilisées pour déterminer des métriques de graphes (par exemple le calcul du plus court chemin entre 2 points du réseau) utilisent des scripts Python, et en particulier les modules *python-igraph*¹⁰, *numpy*¹¹ et *scipy*¹². Le code source de cet outil est maintenu à l'aide de GIT et le dépôt privé est pris en charge sur Bitbucket¹³.

¹⁰ <http://igraph.org/python/>

¹¹ <http://www.numpy.org/>

¹² <http://www.scipy.org/>

¹³ https://joel_lefevre@bitbucket.org/joel_lefevre/graphcorrectiongui.git

3.3.2.1 Visualisation et rendu volumétrique

Le type de visualisation volumétrique choisi est la vue par 3-MIPs. Une projection des intensités maximales (MIP pour *Maximal Intensity Projection*) est formée en affichant sur une image 2D l'intensité maximale rencontrée par des faisceaux parallèles voyageant dans le volume dans une direction définie et depuis une profondeur choisie. Ici l'expression 3-MIPs signifie que trois projections sont calculées, une par direction de parcours des rayons parallèles (direction X, Y ou Z). L'étendue du volume considérée par les projections peut être ajustée et le cube visualisé peut se déplacer dans l'angiographie. Ceci permet un ajustement rapide de la région observée et la taille de la visualisation peut être modifiée selon les structures vasculaires à l'étude. Cette approche de rendu du volume est fréquemment utilisée pour visualiser les angiographies et d'autres types d'images médicales. L'avantage d'afficher 3 MIPs plutôt qu'une seule est qu'on obtient d'un seul coup d'œil l'information 3D des nœuds et segments observés, ce qui est difficile et même parfois ambigu lorsqu'on n'utilise qu'une seule direction de projection. Comme on peut l'observer sur la Figure 3.10, 6 MIPs sont affichées. Les 3 plus grandes correspondent à la région d'intérêt à l'étude (ROI), et les 3 plus petites sont les projections du volume entier. Ces dernières servent de repères visuels afin de savoir où est situé le cube de visualisation dans l'angiographie. Pour chaque triplet de projections, celle en haut à gauche est la projection dans la direction Z, celle en bas à gauche est la projection dans la direction X et la dernière est la projection dans la direction Y.

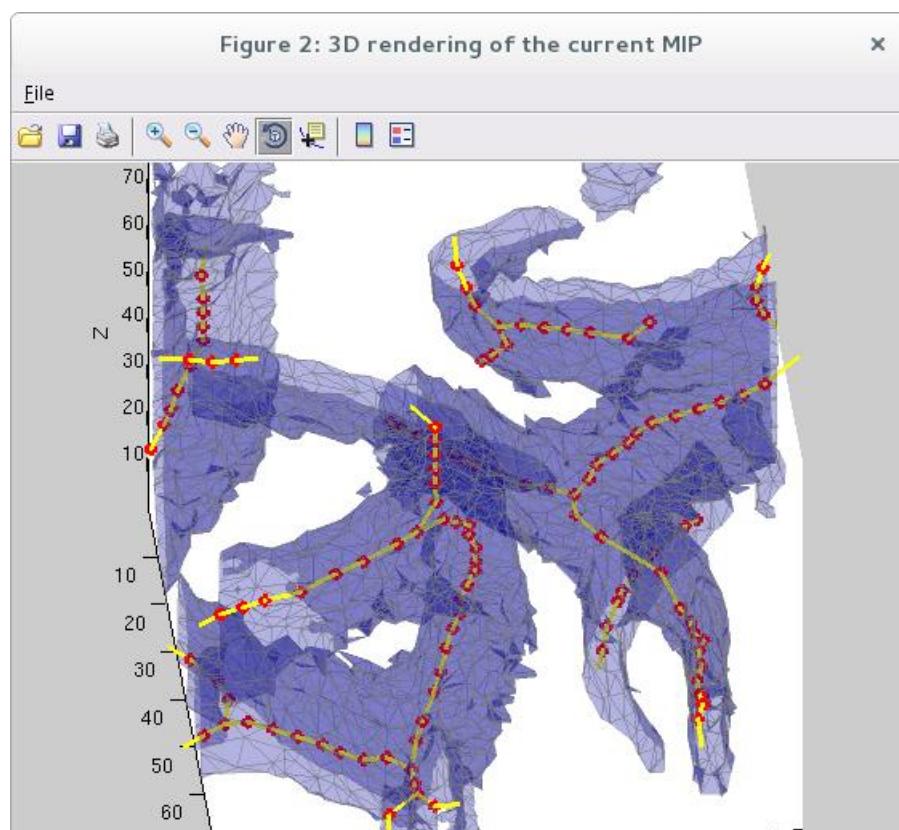


Figure 3.9 Exemple de vue 3D de la surface des vaisseaux sanguins

Les nœuds sont affichés à l'aide de pixels rouges et les liens entre eux par des pixels jaunes. Le rendu du graphe pour la région d'intérêt est superposé au-dessus des MIPs. Il est possible de sélectionner des liens individuels ou un segment complet en utilisant la souris. L'affichage des nœuds et des liens est l'affichage par défaut. D'autres modes d'affichage sont disponibles (par exemple la superposition du volume reconstruit par-dessus les projections du volume original, l'affichage par code de couleur des vaisseaux selon leurs types (capillaires, veinules, artérioles), selon leur distance par rapport à un vaisseau de références, etc.). Finalement, lorsqu'il est difficile de bien comprendre la forme des vaisseaux à l'aide des 3 projections d'intensité, on peut générer le rendu 3D des surfaces des vaisseaux combinées avec le graphe local 3D (Figure 3.9). Ceci permet de vérifier si certains vaisseaux sont connectés dans les cas difficiles.

3.3.2.2 Listes de candidats et critères de sélection

Pour détecter rapidement les erreurs de segmentation, une approche par liste de candidats est utilisée. Plusieurs critères de sélection sont disponibles dans le menu de l'application pour

trouver tous les segments dans le graphe possédant une certaine caractéristique. Ces segments sont ajoutés dans une liste de candidats, c'est-à-dire qu'ils sont considérés comme des erreurs potentielles qu'il faut approuver ou refuser. Une fois les erreurs approuvées, les segments erronés sont retirés du graphe et les métriques du réseau vasculaire sont mises à jour pour une nouvelle itération de correction. Quelques exemples de critères de sélection sont la longueur des vaisseaux, leur nombre de connexions, leur diamètre, le degré de leurs nœuds, leur tortuosité, le profil d'intensité qu'ils traversent, leurs composantes connexes, etc. Ces critères de sélections ont été déterminés de façon empirique au fur et à mesure que les graphes ont été corrigés. Ces critères tentent de repérer les segments problématiques tout en évitant de choisir les vaisseaux ne comportant pas d'erreurs. Une fois les candidats présents dans la liste, il suffit de la parcourir avec les flèches du clavier pour recentrer le cube de visualisation sur chacun d'eux. Par différentes combinaisons de touches, les candidats peuvent être approuvés ou refusés rapidement. Il est aussi possible de sélectionner avec la souris des régions entières du graphe pour effacer les nœuds et les liens qu'elles contiennent (par exemple lorsque une portion du volume contient uniquement du bruit segmenté). L'approche par liste et critères de sélection choisie permet de parcourir rapidement les erreurs potentielles dans le graphe et facilite leur détection. En effet, une angiographie de taille 800x800x500 microns contient typiquement un millier de vaisseaux et quelques centaines de connexions. L'approche par critère de sélection est donc nécessaire pour repérer rapidement les erreurs parmi cette grande quantité d'information. De nouveaux critères peuvent être facilement ajoutés pour améliorer la précision et l'efficacité des méthodes de correction. La combinaison de plusieurs critères, que ce soit par union ou à l'aide d'algorithme d'intelligence artificielle, est une extension directe de cette méthode de repérage des erreurs.

3.3.2.3 Autres fonctionnalités

D'autres outils inclus dans l'interface de correction permettent de créer des nouveaux nœuds et segments et d'ajuster les propriétés des vaisseaux telles que leur position, leur diamètre, leur type (capillaires, veinules ou artérioles), etc. Les menus de l'application contiennent des algorithmes pour estimer et corriger le diamètre des vaisseaux, pour étiqueter les vaisseaux selon leur position dans l'arbre vasculaire, pour calculer des statistiques, pour calculer le débit sanguin dans le graphe en utilisant la méthodologie de (Boas et al., 2008; Fang et al., 2008), etc. L'interface est en constante évolution, car l'approche utilisée permet de facilement ajouter des

nouveaux algorithmes et de nouvelles fonctions. Par exemple, un filtre de particules (Allen et al., 2008) permettant de suivre les vaisseaux sanguins et d'ajouter les nouveaux nœuds au graphe est en cours de développement tout comme un algorithme permettant d'optimiser la position des nœuds d'un vaisseau en fonction de l'intensité locale du volume et d'un modèle d'ellipsoïde généralisé (Tyrrell, Tomaso, & Fuja, 2007). L'interface développée est donc fonctionnelle et versatile. Elle est suffisamment stable pour corriger les graphes de ce projet, et sa modularité permet d'ajouter de nouvelles fonctions et d'améliorer ses performances. Pour terminer, l'interface de correction manuelle possède les caractéristiques suivantes. Rappelons que chacune d'elles était dictée par les différents types d'erreurs observées dans les graphes segmentés. L'interface permet (1) d'observer la structure 3D des vaisseaux, (2) de repérer les segments superflus et les retirer du graphe, (3) de détecter les régions n'ayant pas été tracées, et d'ajouter des nœuds pour les combler et (4) de corriger les caractéristiques des segments erronés.

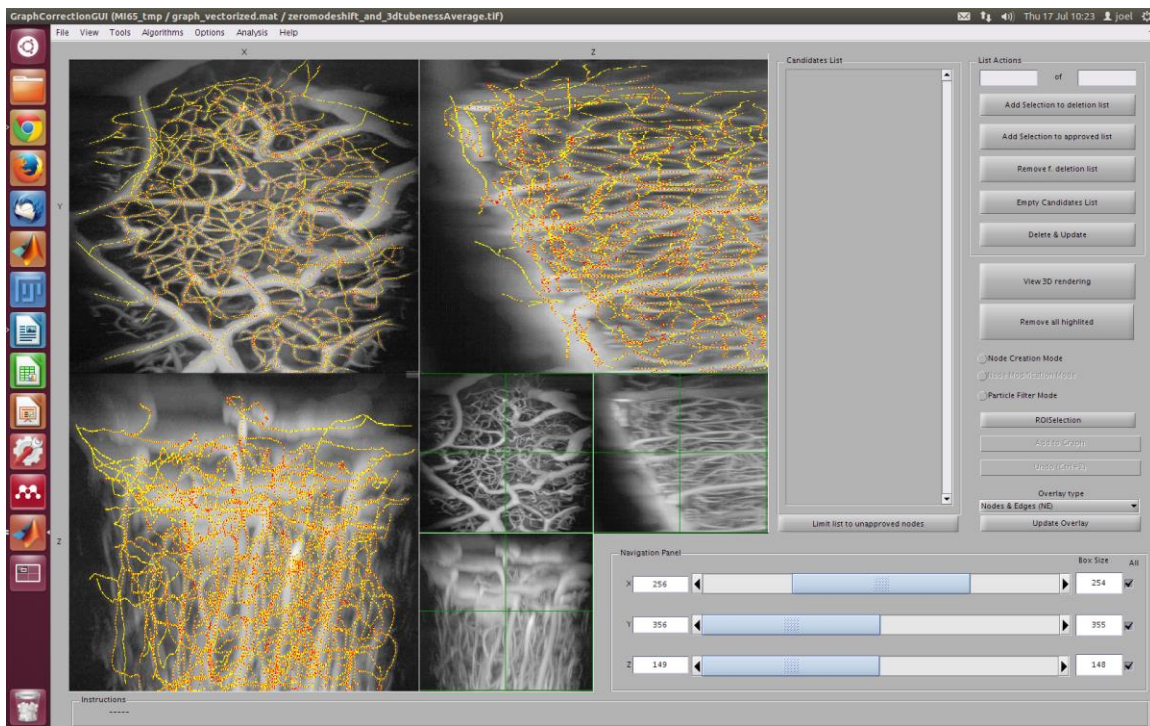


Figure 3.10 Capture d'écran de l'interface *GraphCorrectionGUI*, l'outil de correction manuelle des graphes de VAN. À gauche, la visualisation par 3-MIPs, à droite la liste de candidats et les boutons de gestion de liste, en bas le panneau de navigation. Les critères de sélection pour repérer les erreurs potentielles et peupler la liste de candidats sont accessibles dans le menu « View ». Plusieurs algorithmes et outils sont également disponibles dans les autres menus de l'application.

3.3.2.4 Description des procédures de nettoyage

Pour chaque volume, les procédures suivantes sont appliquées afin de détecter et de corriger les erreurs de segmentation. D'abord, la densité spatiale des nœuds est réduite pour accélérer les procédures de nettoyage. En effet, le très grand nombre de nœuds du graphe obtenu directement après l'analyse du squelette du VAN rend très lent le calcul des métriques de graphes, en particulier l'identification des vaisseaux et des groupes. La distance spatiale entre chaque nœud est donc fixée à un minimum de 2 microns.

L'étape suivante est l'effacement de régions complètes grâce aux outils de sélection de la région d'intérêt (*ROI Selection Tools*). Cette opération est nécessaire pour réduire rapidement la quantité de bruit segmenté dans les portions de volume saturées ou possédant un faible SNR. Les endroits généralement retirés sont le pourtour du volume (faible SNR en raison de l'objectif du microscope), quelques tranches à la surface de l'angiographie (saturation de l'intensité en surface) et d'autres en profondeur (faible SNR en raison de l'atténuation de Beer-Lambert). Cette étape permet généralement de réduire la plus grande quantité d'erreurs.

Ensuite, des erreurs typiques de segmentation sont détectées à l'aide des critères de sélection. Ces critères sont généralement la longueur des segments terminaux, un grand nombre de segments sortants, une faible valeur d'intensité ou une grande variance des intensités traversées par le vaisseau. Les candidats obtenus grâce à ces critères sont d'abord retirés du graphe d'un seul coup, car presque tous ces segments repérés sont des erreurs. Au fur et à mesure que les critères deviennent moins ciblés (par exemple en choisissant des segments terminaux de plus en plus longs), le nombre de segments erronés parmi les candidats diminue et il faut alors parcourir les candidats un à un pour déterminer s'il s'agit d'erreurs ou non. On procède ainsi de façon itérative, à chaque fois en assouplissant les critères de sélection des segments, jusqu'à ce qu'on obtienne un nombre de vaisseaux terminaux bas (typiquement de l'ordre d'une centaine pour une angiographie de taille 800x800x500 microns). À cette étape, certains artefacts de segmentation sont également retirés, comme les cycles ou les connexions en Y. Cette étape de correction vise donc à repérer les segments superflus et à les effacer.

Chaque groupe de vaisseaux (ou composante connectée) est visualisé et l'outil d'ajout de nœuds est utilisé pour relier ces groupes entre eux. La même opération est effectuée avec les

nœuds terminaux situés au centre de l'angiographie pour combler les segments manquants. Il est parfois nécessaire de balayer chaque plan de l'angiographie afin de repérer les vaisseaux manquants et de les tracer à la main. Ces vaisseaux se situent généralement en profondeur du volume et sous les grands vaisseaux. Cette étape de correction vise à repérer les segments manquants et à les ajouter au réseau vasculaire. Une dernière étape vise à corriger les diamètres des vaisseaux et à les étiqueter selon leur position dans l'arbre vasculaire. Ces opérations sont à la fois réalisées à l'aide d'algorithmes et manuellement. La méthode utilisée pour évaluer le diamètre d'un vaisseau est la même que lors du prétraitement des données (Épaisseur locale du masque de la vasculature) à l'exception que dans ce cas seules les intensités dans le voisinage du vaisseau à modifier sont utilisées pour calculer le masque binaire.

Il faut noter que puisque chaque volume est différent, il faut utiliser son jugement quant au choix des méthodes à utiliser pour repérer des erreurs. Par exemple, si on constate que pour un volume particulier il y a peu de mauvaises connexions, mais beaucoup de trous dans les vaisseaux, alors la fermeture des trous dans le graphe est la première étape de correction. Les critères permettant d'estimer la qualité d'un graphe sont le nombre de groupes (qui devrait être unique), le nombre de segments terminaux et leur position (devrait être bas et situé en périphérie du volume) et la distribution du degré des nœuds d'embranchements (devrait être majoritairement de $d=3$, avec quelques embranchements regroupant plus de 4 vaisseaux). Le travail requis pour nettoyer un volume varie entre quelques jours et 2 semaines à temps plein, car la qualité des mesures varie grandement d'une expérience à l'autre. Les procédures de nettoyage ont été réalisées par deux étudiants stagiaires (Imanne El Maachi, Parikshat Sirpal) et par moi-même. À ce jour, une dizaine de graphes ont été nettoyés ou sont en cours de nettoyage.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS

4.1 Résultats de segmentation

Les premières mesures comparant les microvasculatures peuvent être réalisées à la suite du prétraitement des données. La Figure 4.1 présente les étapes principales de la méthode utilisée pour calculer la densité des capillaires dans les volumes à partir des masques binaires 3D du réseau vasculaire. Ce masque est transformé en carte d'épaisseur locale en utilisant l'algorithme présenté dans (Hildebrand & Rüeggsegger, 1997). Les capillaires sont définis comme étant tous les voxels du masque pour lesquels l'épaisseur locale est de 10 microns ou moins. La densité de capillaires de la vasculature est ensuite calculée par le ratio du nombre de voxels appartenant aux capillaires sur le nombre total de voxels dans l'angiographie. En étudiant les 24 angiogrammes (correspondant à 12 jeunes rats et 12 rats âgés), on trouve par cette méthode que la densité volumétrique des capillaires à la surface du néocortex pour les jeunes rats vaut $\rho = 6.8 \pm 0.3$ [% du volume] et que celle pour les rats âgés vaut $\rho = 5.4 \pm 0.3$ [% du volume], ce qui

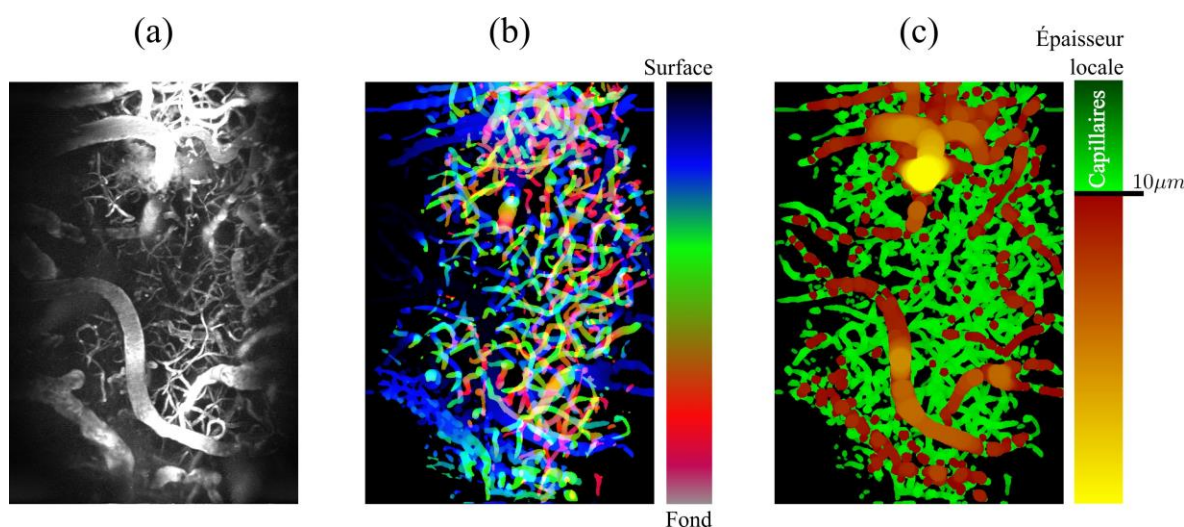


Figure 4.1 Exemple des étapes du calcul de densité à partir du masque de la vasculature. (a) MIP originale de l'angiographie MI12 (b) MIP codée en couleur pour la profondeur du masque de la vasculature obtenu lors du prétraitement, (c) MIP codée en couleur pour le diamètre de la carte d'épaisseur locale du masque du VAN. La densité volumétrique de capillaires est définie comme le rapport du volume occupé par les vaisseaux dont l'épaisseur locale est inférieure à 10 microns sur le volume total de l'angiographie.

représente une diminution de 20%. Cette différence est significative selon un test de Student ($p < 1\%$). Ce résultat indique que la densité volumétrique des capillaires dans le néocortex de rats diminue avec l'âge. Cette étude préliminaire vient compléter les mesures de dynamique vasculaire réalisées par l'étudiante Michèle Desjardins et publiées dans (Desjardins et al., 2014). Tel que mentionné dans l'introduction de ce mémoire, lors de cette étude le faisceau laser du microscope a fait des balayages linéaires rapides le long de plusieurs dizaines de capillaires pour chaque volume. Ces mesures ont entre autres révélé que le débit sanguin et la vitesse des globules rouges dans les capillaires du néocortex de rats augmentent avec l'âge. Ces résultats vont à l'encontre des mesures publiées dans la littérature scientifique qui montrent que le débit sanguin cérébral de base a tendance à diminuer au cours du vieillissement. La diminution de densité des capillaires observée ici a permis d'entrevoir le rôle de la microstructure du réseau vasculaire. En effet, un mécanisme possible expliquant ce résultat est que la diminution de densité volumétrique des capillaires force le sang à se renouveler plus rapidement dans chaque vaisseau pour maintenir un niveau de perfusion optimal. Un débit sanguin plus élevé permet d'assurer un même apport en nutriment et oxygène aux tissus que pour une matrice de capillaires plus dense et parcourue par des débits plus faibles.

4.2 Résultats de vectorisation

L'interface de segmentation développée au cours de ce projet est fonctionnelle et elle est actuellement utilisée pour nettoyer les graphes extraits à partir des angiographies acquises lors de l'étude mentionnée plus haut. À ce jour, 6 réseaux vasculaires ont été nettoyés et 4 autres sont en cours de traitement. Parmi les 6 VANs terminés, 2 sont issus du groupe des rats âgés et 4 du groupe des rats jeunes. La Figure 4.2 présente un exemple d'une microvasculature reconstruite à partir de son graphe achevé.

4.2.1 Caractéristiques des angiographies

Discutons d'abord des caractéristiques principales de ces angiographies pour bien comprendre la taille du réseau vasculaire étudié et l'ampleur du travail requis pour les nettoyer. La longueur totale de vaisseaux par angiographie est de $\bar{L}_t = 50.3 \pm 10.4 \text{ mm}$ si on considère les 6 VANs nettoyés. L'intervalle de confiance pour toutes les mesures mentionnées ici est défini par $x_{\pm 95\%} = \bar{x} \pm SE \times 1.96$ où $SE = \sigma/\sqrt{n}$ est l'erreur type de la moyenne de l'échantillon \bar{x} ,

σ est l'écart type de l'échantillon et n est le nombre d'échantillons (ici $n = 6$). Sachant que le volume moyen des angiographies acquises lors de cette étude est de $\bar{V} = 0,20 \pm 0,01 \text{ mm}^3$, on a que la densité de longueur totale des vaisseaux par unité de volume est d'environ $\rho_l = 240 \left[\frac{\text{mm de vaisseau}}{\text{mm}^3 \text{ de tissu}} \right]$. Cette valeur est élevée et reflète la grande capacité de perfusion de la matrice de capillaires de la neurovasculature. La densité linéaire des vaisseaux est d'ailleurs fréquemment utilisée en neuroscience du vieillissement pour justement avoir un aperçu du niveau de perfusion pouvant être atteint par une région du cerveau donnée, puisque ρ_l est directement liée à la surface disponible par unité de volume pour faire des échanges gazeux et de nutriments avec les tissus (Riddle, 2007). Pour les volumes traités, la densité de vaisseaux sanguins est en moyenne de $\rho_v = 8060 \pm 812 \left[\frac{\# \text{ vaisseaux}}{\text{mm}^3} \right]$, ce qui représente une moyenne de $n_v = 724 \pm 142$ vaisseaux visibles par angiographies. D'autre part, le nombre de connexions entre des vaisseaux par unité de volume est en moyenne de $\rho_{cx} = 6394 \pm 406 \left[\frac{\# \text{ connexions}}{\text{mm}^3} \right]$ pour les volumes traités, ce qui représente environ $n_{cx} = 434 \pm 94$ connexions visibles par angiographie. Toutes ces valeurs permettent de comprendre que la microvasculature étudiée dans ce projet est très dense et hautement interconnectée. D'ailleurs, le ratio entre le nombre de connexions et le nombre de vaisseaux est de $R_{n/e} = 0,80 \pm 0,04 \left[\frac{\# \text{ noeuds}}{\# \text{ vaisseaux}} \right]$ pour les 6 VANs traités.

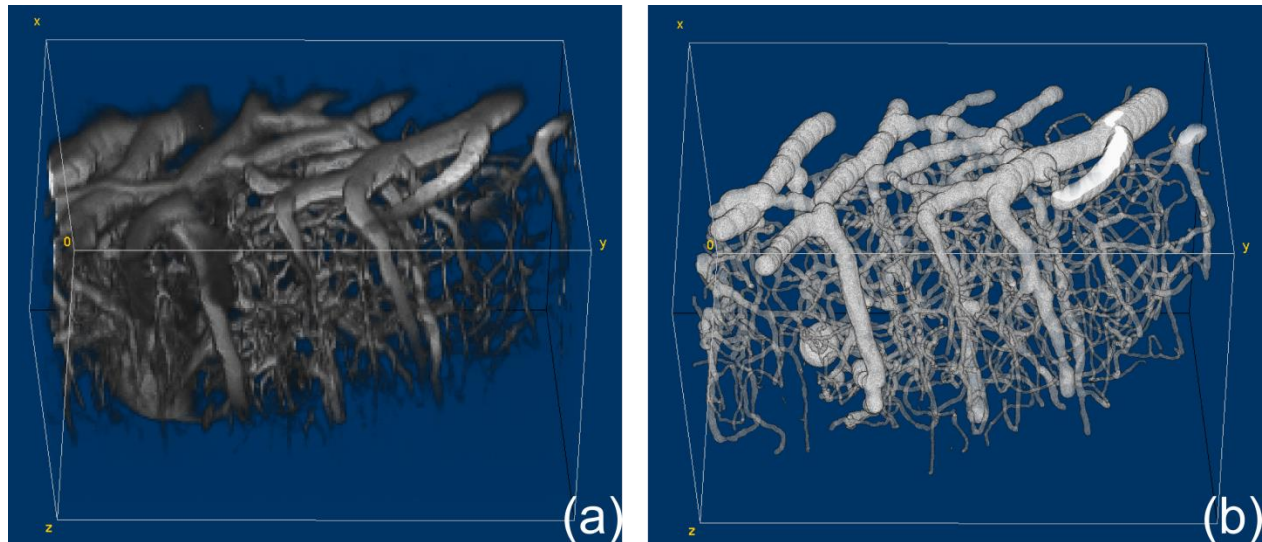


Figure 4.2 Rendu volumétrique d'une angiographie du néocortex (MI63). (a) Volume original, (b) Volume reconstruit à partir du graphe du VAN

Il est toutefois important de souligner que les différentes sources de bruit liées à ce type de mesure ne permettent pas de voir des vaisseaux dans toutes les régions du volume couvert par l'angiographie. Certaines portions telles que la périphérie ou le fond du volume possèdent un faible SNR et il n'est pas possible de voir de vaisseaux à ces endroits. Si on considère cette limitation, le volume effectif dans lequel il a été possible de segmenter et de vectoriser les vaisseaux sanguins est en moyenne de $V_{eff} = 0,09 \pm 0,01 [mm^3]$ pour les angiographies traitées. Ce volume est obtenu en calculant l'enveloppe convexe 3D de la vasculature reconstruite à partir de son graphe. Le montage optique et la méthode de segmentation développée ici permettent donc d'observer des vaisseaux dans $48 \pm 4 [\%]$ du volume des angiographies. En considérant ce volume effectif, on remarque entre autres que la mesure de perfusion devient $\rho_l = 561 \pm 57 \left[\frac{mm \text{ vaisseaux}}{mm^3 \text{ tissus}} \right]$, donc que la densité linéaire de vaisseaux par unité de volume est 2.34 fois plus élevée que la valeur mentionnée plus haut.

Pour terminer cette description de la qualité des données et des performances de l'algorithme développé durant ce projet, voici quelques mesures obtenues lors du prétraitement des angiographies. Étant donné la nature du système cardiovasculaire, on s'attend à ne retrouver qu'un seul réseau de vaisseaux (ou composante connectée) dans chaque angiographie. Également, on s'attend à ce que les vaisseaux terminaux (c'est-à-dire ceux dont une des extrémités n'est pas connectée à un autre vaisseau) soient situés uniquement près des frontières du volume de l'angiographie. Toutefois, une analyse des composantes connectées des squelettes issus du prétraitement révèle qu'il y a en moyenne 350 réseaux vasculaires indépendants repérés par angiographie, et une simple inspection visuelle permet de constater que les vaisseaux terminaux ne sont pas uniquement situés en périphérie, mais sont distribués de façon uniforme dans tout le volume. On peut arriver à la même conclusion en observant les squelettes calculés pour les jeunes rats illustrés à la Figure 4.3. Plusieurs branches du graphe pour lesquelles un des nœuds est de degré 1 ont été générées par l'algorithme de squelettisation pour conserver les textures de surface du masque des vaisseaux et ne sont donc pas utiles à la description de la microvasculature si l'on s'intéresse uniquement à son réseau. On constate également par inspection visuelle qu'une certaine quantité de bruit a été segmentée, la plupart du temps en surface et en profondeur du volume. Ces observations permettent de bien comprendre l'ampleur du travail requis par le nettoyage des graphes, puisqu'il faut (1) réduire le nombre de groupe à un seul en connectant

manuellement les communautés séparées, (2) limiter les vaisseaux terminaux à la périphérie du volume et (3) effacer les branches du graphe qui représentent du bruit segmenté ou qui ne sont pas nécessaires pour modéliser le réseau vasculaire. Selon la qualité des segmentations et des angiographies, le nettoyage en utilisant les outils développés dans ce projet peut nécessiter jusqu'à 2 semaines de travail à temps plein par volume, selon l'expérience de l'utilisateur. Ceci explique donc la raison pour laquelle uniquement 6 volumes ont pu être nettoyés à ce jour, sachant que le développement de la méthode de prétraitement et de l'interface de correction manuelle a occupé la plus grande partie de la durée de ce projet de maîtrise.

4.2.2 Effet du nettoyage des angiographies

Dans les paragraphes qui suivent, les VANs obtenus directement à partir de la méthode de prétraitement sont comparés avec les 6 graphes nettoyés. Ceci permet de constater l'effet du nettoyage sur les propriétés des réseaux vasculaires. La Figure 4.3 présente les squelettes issus du prétraitement des angiographies pour le groupe de rats jeunes seulement. Ce sont ces représentations de la vasculature qui sont utilisées pour cette analyse. La Figure A.1 présentée en

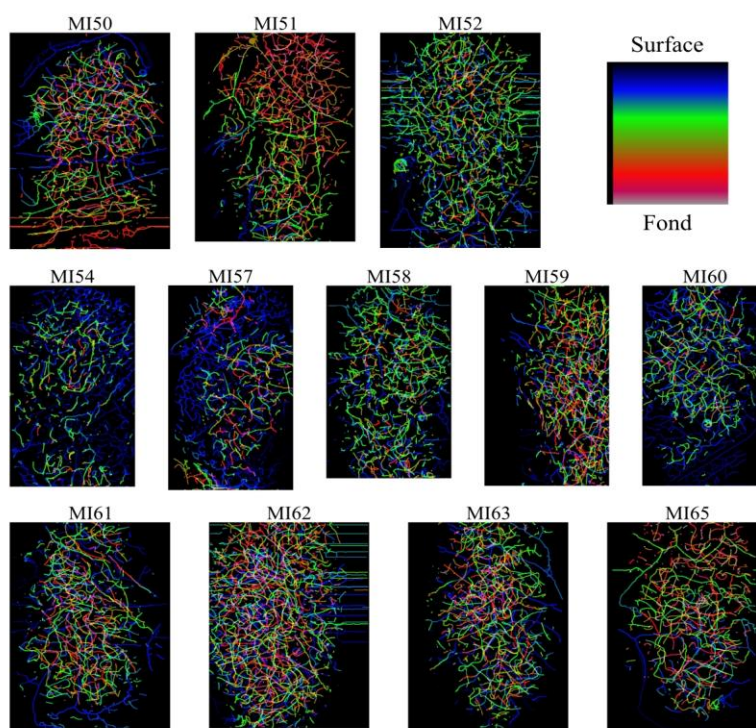


Figure 4.3 Projections de l'intensité maximale codée en couleur pour les squelettes des angiographies des jeunes rats. Les squelettes sont obtenus directement à partir de la segmentation de la vasculature réalisée lors du prétraitement des données.

annexe à la page 91 est l'équivalent pour les squelettes des angiographies des rats âgés. Notons finalement que tous les résultats discutés dans cette section sont résumés dans le Tableau 4.1.

Tableau 4.1 Métriques liées aux vaisseaux sanguins, aux points d'embranchement et au réseau calculés à partir des graphes (nettoyés ou non).

Mesures	Unités	Squelette			Graphes nettoyés		
		Tous	Jeunes	Vieux	Tous	Jeunes	Vieux
Nombre de vaisseaux	#vaisseaux	1794 ± 327	1521 ± 316	2066 ± 544	724 ± 142	726 ± 222	718 ± 90
Longueur totale des vaisseaux	mm	54 ± 6	50 ± 7	59 ± 9	50 ± 10	54 ± 14	44 ± 13
Longueur moyenne des vaisseaux	micron	33 ± 4	36 ± 6	31 ± 4	70 ± 9	74 ± 3	62 ± 25
Diamètre moyen des vaisseaux	micron	14,2 ± 0,8	14,2 ± 1,5	14,1 ± 0,7	14 ± 4	12 ± 3	17 ± 10
Proportion de capillaires	$\frac{\# \text{ cap.}}{\# \text{ vaisseaux}}$	0,63 ± 0,05	0,64 ± 0,08	0,62 ± 0,06	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,4
Volume Effectif	mm ³	0,081 ± 0,007	0,081 ± 0,008	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,085 ± 0,003
Volume de l'angiographie	mm ³	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,16 ± 0,02
Couverture du VAN	%	41 ± 5	42 ± 5	40 ± 9	48 ± 4	45 ± 2	53 ± 4
Nombre de B.P.	# de B.P.	716 ± 149	609 ± 138	823 ± 257	434 ± 94	437 ± 146	430 ± 72
Densité de B.P.	$\frac{\text{B.P.} + \text{E.P.}}{V_{\text{eff}}}$	2,5E+04 ± 5,2E+03	2,1E+04 ± 2,8E+03	3,0E+04 ± 9,4E+03	6394 ± 406	6243 ± 530	6694 ± 521
Ratio	$\frac{\text{B.P.} + \text{E.P.}}{\# \text{ vaisseaux}}$	1,11 ± 0,06	1,13 ± 0,07	1,09 ± 0,09	0,80 ± 0,04	0,80 ± 0,05	0,80 ± 0,07
Nœuds / Vaisseaux	# vaisseaux	722 ± 135	616 ± 53	828 ± 256	561 ± 57	583 ± 58	515 ± 129
Densité de longueur	mm/mm ³	525 ± 112	449 ± 61	600 ± 212	345 ± 120	397 ± 119	242 ± 267
Densité de longueur de capillaires	mm/mm ³	525 ± 112	449 ± 61	600 ± 212	345 ± 120	397 ± 119	242 ± 267
Densité de vaisseau (Vol.)	mm ³ /mm ³	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,06	0,17 ± 0,04	0,12 ± 0,05	0,10 ± 0,04	0,14 ± 0,13
Densité de vaisseau	$\frac{\# \text{ vaisseaux}}{\text{mm}^3}$	2,3E+04 ± 4,8E+03	1,9E+04 ± 3,4E+03	2,8E+04 ± 8,3E+03	8060 ± 812	7871 ± 1095	8439 ± 1368
Nb. échantillon	# graphes	24	12	12	6	4	2

Les premières mesures réalisées comparent les caractéristiques des vaisseaux sanguins et sont la longueur moyenne \bar{L} et le diamètre moyen \bar{d} des vaisseaux. Pour les graphes non nettoyés, $\bar{L}_v = 33 \pm 4 [\mu m]$ alors que cette valeur devient $\bar{L} = 70 \pm 9 [\mu m]$ pour les graphes nettoyés. La longueur moyenne des vaisseaux augmente lors de la correction manuelle des réseaux vasculaires, car tous les segments superflus séparant les vaisseaux en plusieurs partis sont enlevés. Le diamètre moyen demeure quant à lui inchangé ($\bar{d}_v = 14.2 \pm 0,8 \mu m$ v.s. $\bar{d} = 14 \pm 4 \mu m$). Le diamètre moyen n'est pas modifié, car le même algorithme est utilisé pour les deux types de graphe pour calculer cette valeur, et parce que les segments retirés servaient à décrire la texture de surface des vaisseaux plutôt que leur diamètre.

La densité volumétrique de la vasculature est ensuite calculée (ρ_v). Cette valeur est obtenue en reconstruisant le VAN à partir de son graphe, puis en calculant le volume effectif (V_{eff}) occupé par cette vasculature à l'aide de l'enveloppe convexe 3D des vaisseaux reconstruits. La densité volumétrique du VAN est définie comme étant le rapport du volume contenu dans les vaisseaux sur le volume effectif. Le volume effectif est environ le même pour

toutes les angiographies et n'est pas modifié par la correction manuelle des VANs, tel qu'on peut le voir dans le Tableau 4.1. Par contre, la densité volumétrique du VAN décroît après la correction manuelle : $\rho_{v,v} = 0,15 \pm 0,04 \left[\frac{mm^3 \text{ vaisseaux}}{mm^3 \text{ tissu}} \right]$ vs. $\rho_v = 0,12 \pm 0,05 \left[\frac{mm^3 \text{ vaisseaux}}{mm^3 \text{ tissu}} \right]$, ce qui est principalement dû à l'effacement du bruit segmenté dans les graphes. La densité linéaire des vaisseaux diminue également. ρ_l est définie par le rapport de la longueur totale de la vasculature sur le volume effectif occupé par celle-ci. Cette valeur passe de $\rho_{l,v} = 722 \pm 135 [mm^{-2}]$ à $\rho_l = 561 \pm 57 [mm^{-2}]$, ce qui s'explique par le fait que le squelette original contenait plusieurs vaisseaux non significatifs pour la description du réseau vasculaire.

Un autre effet notable du nettoyage du graphe est la diminution du ratio Nœuds/Vaisseaux, qui passe de $R_{n/e,v} = 1,11 \pm 0,06$ à $R_{n/e} = 0,80 \pm 0,04$. Ceci montre que la méthode de prétraitement génère plusieurs vaisseaux superflus ou fragmentés et connexions erronées. En effet, le nombre de vaisseaux n_v diminue de près de 60 % et le nombre de connexions n_{cx} diminue d'environ 40% lors du nettoyage. La correction manuelle a également un effet sur la distribution des angles entre les vaisseaux connectés, tel qu'on peut l'observer sur la Figure 4.4. Pour calculer l'angle θ_b entre des vaisseaux connectés au même point d'embranchement \vec{x}_b , la direction \vec{d}_i de chaque vaisseau par rapport au point \vec{x}_b est déterminée. Ensuite, le produit scalaire entre chaque combinaison de vaisseaux connectés est calculé et

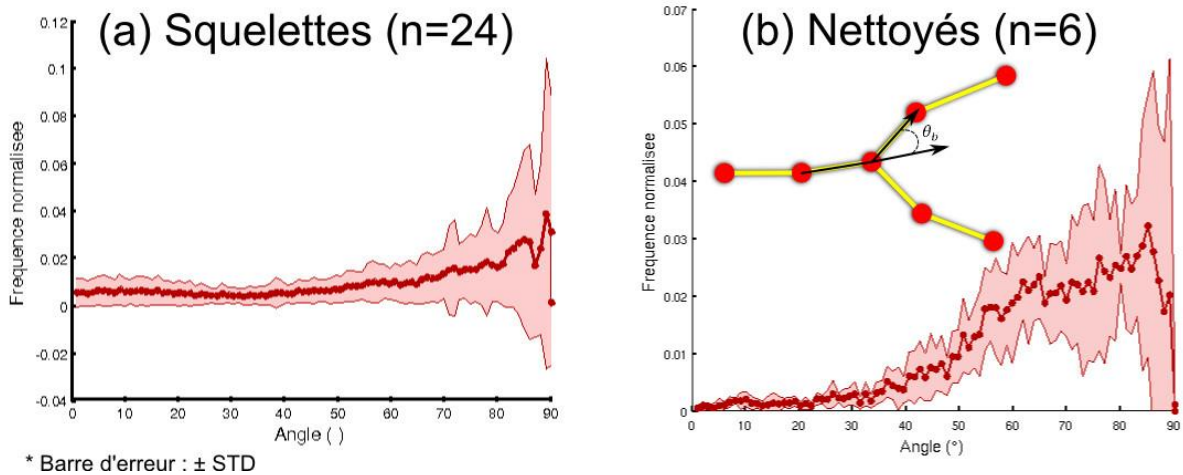


Figure 4.4 Distribution des angles (aigus) entre des vaisseaux connectés (a) pour tous les graphes (b) pour les graphes nettoyés uniquement. L'intervalle d'erreur est défini en tout point par l'écart type des échantillons.

l'angle entre ceux-ci est déterminé par $\theta_b = \arccos(\vec{d}_1 \cdot \vec{d}_2)$. On observe que pour les graphes non nettoyés, il y a très peu de couples de vaisseaux pour lesquels l'angle les séparant est inférieur à 70° . Pour les 6 VANs nettoyés, la fréquence des angles entre 40° et 80° est augmentée.

Pour terminer cette description de l'effet du nettoyage des graphes, la carte des distances d'adjacence à un vaisseau sanguin du tissu cérébral a été calculée pour chaque angiographie (voir la Figure 4.5). Pour ce faire, la vasculature est d'abord reconstruite à partir des informations contenues dans son graphe. Ce masque du VAN est ensuite inversé et une transformation de distance euclidienne est appliquée. Ceci permet de connaître la distance minimum entre chaque voxel de tissu et le vaisseau le plus près. Il s'agit donc d'une mesure liée à la densité du réseau vasculaire et une indication des performances de perfusion que la vasculature doit posséder. Les histogrammes des cartes de distance pour chaque vasculature sont comparés à la Figure 4.6. Il faut noter que pour limiter les effets de bords, où peu de vaisseaux sont détectés, seules les distances mesurées à l'intérieur du volume effectif sont considérées. Ce qu'on peut constater est que le nettoyage a pour effet de réduire la variabilité des distances d'adjacence (l'écart-type en tout point de l'histogramme est plus faible). Le mode de la distribution de distance d'adjacence se situe autour de $15\mu m$ si on considère tous les graphes non nettoyés, et celle-ci semble baisser à $12\mu m$ pour les graphes traités. Lorsqu'on compare les cartes de distance pour les 2 groupes d'âge, on constate que la variabilité est plus grande pour les rats âgés que pour les rats jeunes, bien que le mode des distances d'adjacence soit similaire pour les deux groupes.

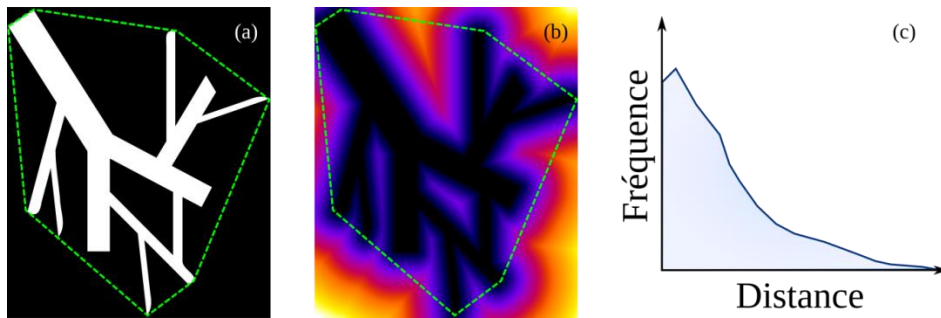


Figure 4.5 Méthode utilisée pour calculer la carte des distances d'adjacence à un vaisseau (a) Masque du réseau vasculaire. (b) Carte de distance d'adjacence à un vaisseau (c) Histogramme des distances. La ligne pointillée verte représente l'enveloppe convexe du masque de la vasculature. Seuls les voxels de tissus inclus dans cette enveloppe convexe sont considérés lors de l'analyse.

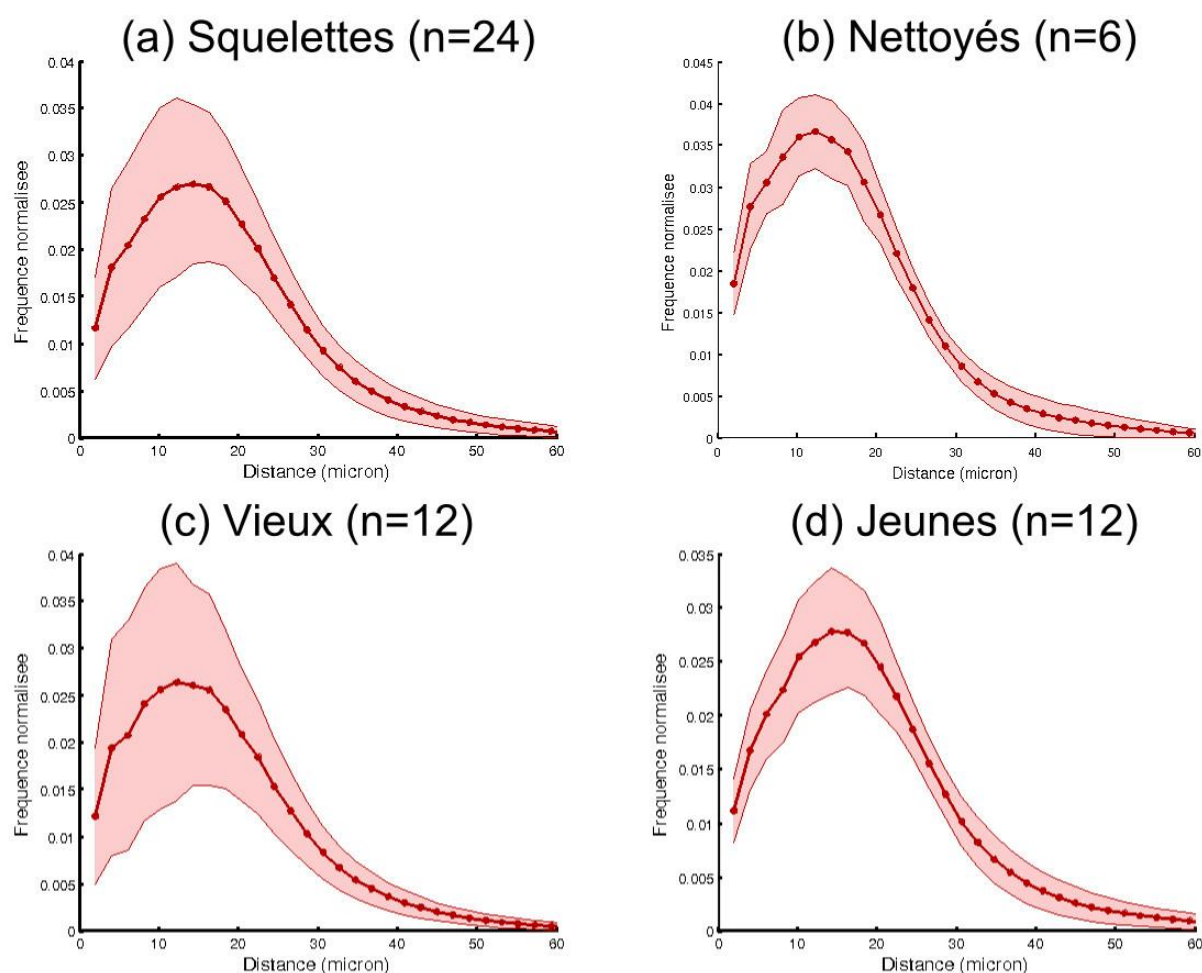


Figure 4.6 Distribution de la distance d'adjacence à un vaisseau sanguin des tissus du néocortex (a) pour tous les graphes non nettoyés, (b) pour tous les graphes nettoyés, (c) pour tous les graphes non nettoyés du groupe âgé, et (d) pour tous les graphes non nettoyés du groupe jeune. L'intervalle d'erreur est défini en tout point par l'écart type des échantillons.

4.2.3 Comparaison des VANs entre les groupes d'âge

Les caractéristiques des graphes sont également comparées entre les deux cohortes de rats, bien que le nombre limité d'échantillons dans chacune des populations empêche de tirer des conclusions significatives pour l'instant. Pour cette analyse, seuls les graphes traités sont utilisés puisqu'on a vu dans la section précédente que les graphes obtenus lors du prétraitement contiennent plusieurs vaisseaux superflus ou fragmentés et qu'une partie des erreurs provient du bruit segmenté. Rappelons d'abord qu'une analyse préliminaire réalisée sur le masque des microvasculatures avant qu'ils ne soient transformés en squelette a révélé que la densité des

capillaires tend à diminuer avec l'âge dans le néocortex des rats. Les mesures directes réalisées sur les graphes traités, bien que fragmentaires, semblent aller dans ce sens. Par exemple, la densité de longueur de tous les vaisseaux est de $\rho_{l,j} = 583 \pm 58[mm^{-2}]$ pour les jeunes rats et de $\rho_{l,a} = 515 \pm 129[mm^{-2}]$ pour les rats âgés. Si on ne s'intéresse qu'aux capillaires, la différence entre les valeurs moyennes de la densité linéaire est plus grande, même si les intervalles d'erreurs demeurent importants ($\rho_{lc,a} = 397 \pm 119[mm^{-2}]$ vs $\rho_{lc,a} = 242 \pm 267[mm^{-2}]$). Les résultats restent très fragmentaires, puisqu'à ce jour seuls 4 jeunes rats et 2 rats âgés possèdent des angiographies cartographiées correctement. Plus de comparaisons pourront être faites lorsque de nouveaux graphes traités seront ajoutés. Aucune différence significative n'a été trouvée en utilisant un test de Student pour comparer les mesures de chaque groupe.

CHAPITRE 5 DISCUSSION

Ce chapitre consiste en une discussion critique des différentes méthodes adoptées pour extraire les réseaux vasculaires à partir des angiographies et pour effacer les erreurs qu'ils contiennent. Il est d'abord question de la méthode de segmentation et d'extraction des vaisseaux sanguins. Les défauts de cette méthode sont présentés, et quelques propositions d'améliorations sont mentionnées. Puis, ce sont les principales limitations de l'interface de correction manuelle qui sont abordées, et quelques solutions sont proposées. Finalement, les limitations et la suite de l'analyse des vasculatures dans le contexte du vieillissement sont discutées.

5.1 Performance de la méthode d'extraction du VAN

Les résultats de segmentation ont permis de montrer que les principales limitations de la méthode implémentée durant ce projet sont l'apparition de trous dans la vasculature, la segmentation du bruit et les erreurs de positionnement des vaisseaux. Ces erreurs sont dues à plusieurs facteurs, que ce soit la qualité des données, les performances de la méthode de segmentation ou l'apparition d'artefacts lors du prétraitement. Passons en revue quelques étapes de l'algorithme de segmentation afin de mettre le doigt sur leurs limitations et les solutions potentielles.

D'abord, quelques étapes réalisées lors de la segmentation des angiographies peuvent causer des problèmes. La première étape du prétraitement est le *rééchantillonnage des volumes* afin d'obtenir des voxels de même dimension dans toutes les directions spatiales. Cette opération est réalisée, car plusieurs filtres numériques utilisés par la suite nécessitent des voxels isotropes. Puisque la plus petite dimension d'un voxel sert à déterminer comment les deux autres directions seront rééchantillonnées, on se retrouve dans les faits à suréchantillonner 2 directions du volume. En plus d'augmenter la taille des angiographies et le temps de calcul nécessaire par la suite pour les segmenter, cette opération risque d'introduire des artefacts dans le volume comme des ombres d'intensité et l'élargissement du bruit ponctuel dans certaines directions qui acquiert ainsi une « forme tubulaire » et qui est rehaussée par les filtres de Frangi ou de Sato. De plus, cette opération ajoute de l'information redondante, la position des vaisseaux étant déjà bien représentée par la numérisation originale. Une façon de corriger cet effet serait d'effectuer un *binning* (combinaison de voxels) du volume plutôt que d'augmenter sa dimension. En réduisant

la quantité d'information, on diminue d'une part les ressources informatiques nécessaires à la segmentation de la vasculature, et on diminue l'effet du bruit sur la segmentation, celui-ci étant moyenné lors de la réduction des dimensions du volume. Il faut toutefois être prudent et ne pas réduire la taille des angiographies sous la fréquence de Nyquist des plus petits objets observables. Dans le cas des microvasculatures étudiées, cette fréquence est déterminée par la taille des capillaires et par la plus petite distance séparant 2 vaisseaux adjacents.

Un second point d'amélioration concerne la correction des déformations introduites par les miroirs galvanométriques, qui est effectuée en appliquant simplement une translation rigide des lignes paires du volume par rapport aux lignes impaires. Toutefois, les miroirs de ce montage ne déforment pas les mesures de façon linéaire et cette déformation est différente selon la direction de balayage. La texture des vaisseaux conserve donc un aspect dentelé pour certaines régions du volume et cela entraîne l'apparition de bruit dans les graphes. Il faudrait donc utiliser une transformation non linéaire pour corriger cet effet ou bien changer la méthode de balayage du miroir pour limiter la déformation des données *in situ*. Une autre solution possible serait d'enregistrer le parcours temporel des miroirs durant l'acquisition. Il suffirait ensuite d'utiliser cette information dans un modèle de reconstruction des images utilisant la PSF du microscope pour reformer le volume de l'angiographie dans un espace linéaire non déformé. La connaissance de la position temporelle des miroirs permettrait alors d'améliorer l'apparence de la surface des vaisseaux sanguins et les performances de la vectorisation seraient améliorées.

Par la suite, l'arrière-plan du volume est effacé tranche par tranche en utilisant l'algorithme « Rolling Ball ». Cette méthode, bien qu'elle permette d'augmenter le contraste local de tous les objets dans le volume, dont les vaisseaux, introduit des artefacts qui se retrouvent segmentés dans le masque de la vasculature. En effet, la taille de l'élément de convolution pour cet algorithme doit être au moins plus grande que le plus grand élément d'avant-plan à conserver dans l'image. S'il est trop petit, les régions d'intensité uniforme dans les grands vaisseaux disparaissent. Aussi, l'algorithme de base implémenté dans FIJI utilise un noyau de convolution rectangulaire, ce qui mène parfois à l'apparition de cette forme dans les intensités ajustées. Une seconde source d'artefact provient du filtre de Sato utilisé pour rehausser le contraste des vaisseaux sanguins. La paroi des grands vaisseaux est interprétée par ce filtre comme étant une structure tubulaire de faible épaisseur. Le contraste des parois est donc davantage rehaussé par rapport au centre des vaisseaux, ce qui provoque leur segmentation préférentielle. La

squelettisation repère donc des segments dans la paroi des grands vaisseaux, alors qu'on ne devrait observer qu'un seul segment au centre de ceux-ci. Pour corriger ces artefacts qui rendent difficile la segmentation adéquate des vaisseaux, d'autres approches pourraient être utilisées pour améliorer le contraste local des structures tubulaires. On n'a qu'à penser au filtre diffusant anisotrope 3D, qui permet de régulariser l'intensité dans les vaisseaux en se basant sur la matrice hessienne du volume, tout en réduisant le bruit dans l'arrière-plan (Manniesing et al., 2006).

La limitation principale de la méthode de segmentation provient toutefois de l'hypothèse erronée qui est posée quant à la nature des données utilisées pour segmenter l'angiographie, soit que le masque de la vasculature ne contient aucune erreur et que l'algorithme de squelettisation utilisé pour le transformer en graphe ne fournit que des segments utiles à la description du réseau vasculaire. On peut constater, à la vue des erreurs mentionnées plus haut, que cette hypothèse centrale sur laquelle repose la méthode d'extraction développée n'est pas toujours respectée. Certaines régions du volume sont sur segmentée (p.ex. bruit, les zones saturées) alors que d'autres sont sous représentés et contiennent des trous (p.ex. ombrage des grands vaisseaux ou lors de la présence d'un globule rouge dans un capillaire). La méthode utilisée durant ce projet ne considère que des mesures d'intensité et de similarité aux vaisseaux pour créer le masque des VANs. Elle est donc très sensible au bruit contenu dans les volumes, aux artefacts introduits par le montage expérimental ou par les filtres de traitements d'images, et à la variabilité intrinsèque qu'on observe dans ce type d'expérience d'un individu à l'autre. Tel que mentionné dans la méthodologie, la texture de surface des vaisseaux peut grandement modifier la topologie du squelette obtenu. Bref, la méthode utilisée est déterministe, c'est-à-dire qu'elle suppose que les conditions initiales du problème de segmentation sont parfaitement connues et donc que la vasculature obtenue sera fidèle à la réalité.

Étant donné les erreurs contenues dans le masque de la vasculature, différentes approches pourraient être utilisées au lieu de la squelettisation pour tenter d'améliorer les performances de l'extraction des vaisseaux. Par exemple, il serait possible de travailler à partir du masque des vaisseaux et d'optimiser la position de la surface de ce masque en fonction de diverses contraintes géométriques et topologiques (Méthode de surface active; (Gooya et al., 2012)). Il serait également possible d'utiliser une méthode stochastique plutôt que déterministe pour détecter les vaisseaux, tels que des filtres de particules (Allen et al., 2008) ou l'optimisation par croissance stochastique d'un modèle de la vasculature (Lacoste et al., 2006). La méthode

originale pourrait aussi être combinée avec un autre algorithme, par exemple en servant de valeur initiale pour l'optimisation des positions de superellipsoïdes, qui sont utilisées pour représenter les vaisseaux (Tyrrell et al., 2007). Finalement, au lieu d'utiliser une approche systématique pour déterminer les seuils d'intensité, il serait préférable d'utiliser une méthode adaptative localement pour s'adapter aux variations locales qui peuvent être dues à un effet d'ombrage, à la position de numérisation par rapport au centre de l'axe optique, à la profondeur observée, etc.

L'analyse des angiographies lors de ce projet et les performances de la méthode d'extraction permettent de comprendre que la méthode actuelle doit être plus robuste face au bruit contenu dans les volumes. D'une expérience à l'autre, les caractéristiques des volumes peuvent varier grandement. Donc le protocole expérimental devrait être amélioré pour rendre les expériences plus reproductibles, plus robustes, et moins dépendantes des variabilités du montage, de sorte que les variations observées soient attribuées uniquement à la physiologie de la vasculature des rats étudiés et non plus à des variations expérimentales telles que la saturation à la surface. Certains algorithmes pourraient être améliorés, et le pipeline de traitement pourrait être modifié. Par exemple, le rehaussement du contraste local, l'optimisation de la surface du masque, le post-traitement automatique du squelette des VANs sont tous des approches qui pourraient être exploitées. Quelques étapes de l'algorithme développé nécessitent une supervision ou des corrections manuelles. On n'a qu'à penser à l'étape du rehaussement global du contraste du volume pour ajuster l'histogramme d'intensité afin de mieux visualiser les structures tubulaires. La mise en place de critères d'évaluation automatiques (H. Zhang, Fritts, & Goldman, 2008), ne nécessitant pas de supervision, serait un avantage d'une part pour rendre les algorithmes plus robustes face aux variabilités interexpérimentales, et d'autres parts dans l'optique du traitement de cerveau entier, qui rend tout à fait impensable l'intervention manuelle considérant la quantité énorme de données à traiter. L'utilisation d'un apprentissage machine pourrait également permettre de trouver les meilleurs paramètres des différents filtres utilisés et ainsi obtenir de meilleurs résultats.

5.2 Performance de l'outil de correction manuelle

Le nettoyage des graphes à l'aide de l'outil de correction manuelle (GCG) est essentiel. Cela permet de combler les portions manquantes du réseau vasculaire et d'effacer les segments superflus. Tel que mentionné dans la section résultat, le nombre de vaisseaux baisse d'environ

60% et le nombre de connexions baisse de 40% pendant le nettoyage des graphes. Le but de cette étape est d'obtenir un réseau vasculaire le plus complet et fidèle possible, sans trous et pour lequel toutes les connexions sont correctes. Les graphes nettoyés servent pour la comparaison de l'architecture de la microvasculature entre différents groupes d'âge, et il peut aussi servir de base de simulation pour modéliser le débit sanguin dans l'angiographie. À ce jour, 6 VANs ont été nettoyés, chacun nécessitant de quelques jours à 2 semaines de travail à temps plein.

Le processus d'interaction manuelle pour corriger les graphes est long et répétitif. La procédure de traitement présentée dans la méthodologie est appliquée de façon itérative jusqu'à ce que certains critères liés aux propriétés du graphe soient atteints. Les principales limitations de l'outil d'interaction manuelle développé au cours de ce projet sont : (1) Les corrections nécessitent beaucoup d'interactions manuelles pour repérer les erreurs et pour tracer les vaisseaux manquants. Ces manipulations sont parfois lentes et peu réactives. (2) L'interface est lente et il est parfois difficile de bien distinguer la structure tridimensionnelle des vaisseaux en cours de traitement. (3) Les métriques utilisées pour repérer les erreurs de vectorisation génèrent une grande quantité de faux positif ou de faux négatif, selon les cas. Également, il est difficile de déterminer des critères qui fonctionnent bien pour tous les graphes. (4) Aucune mesure basée sur la physiologie ou la topologie de la microvasculature n'est utilisée pour guider la correction des réseaux vasculaires. Ces quelques limitations techniques ou méthodologiques rendent le travail de nettoyage ardu et lent. Les principaux critères de sélection permettant de repérer les erreurs sont déterminés de façon empirique, et l'efficacité de chacun d'eux peut changer d'une expérience à l'autre.

Pour régler le premier problème (grand nombre d'interaction manuelle), il pourrait être utile d'ajouter des méthodes automatiques de suivi de vaisseaux, un outil pour trouver le plus court chemin entre 2 points, et un algorithme de fermeture de trous dans une vasculature basée sur l'élection de tenseur (Risser, Plouraboue, & Descombes, 2008). Ces outils permettraient de combler les trous dans le graphe en une seule étape sans avoir besoin de tracer à la main avec la souris le parcours de chaque vaisseau manquant. Il peut s'agir aussi d'outils intéressants pour faire de l'exploration de vasculature dans les régions pour lesquelles le SNR est plus faible, étant donné que les méthodes de suivi de vaisseaux peuvent être basées sur un modèle stochastique. Dans ce but, un filtre de particule est d'ailleurs en cours d'implémentation (Allen et al., 2008). Pour améliorer la détection des vaisseaux superflus, il serait intéressant d'utiliser des algorithmes

d'apprentissage machine pour combiner plusieurs critères de sélection et trouver les meilleurs estimateurs d'erreur (Kaufhold, Tsai, Blinder, & Kleinfeld, 2012). Ceci pourrait nécessiter des périodes d'entraînement pour chacun des graphes puisque les angiographies peuvent varier grandement d'une expérience à l'autre. Il serait également intéressant d'intégrer des mesures basées sur la physiologie et la topologie de la microvasculaire pour guider le nettoyage des réseaux vasculaires. Pensons simplement à une comparaison du graphe en traitement avec un réseau théorique hautement interconnecté ou basé sur l'architecture neurovasculaire typique (tel que représenté dans la littérature). Si le réseau réel segmenté présente des caractéristiques de graphe qui ne sont pas dans la norme, cela représente une région à vérifier. Ceci permettrait également de réutiliser les valeurs d'intensité contenue dans la microvasculature pour guider l'optimisation du graphe. Les angiographies ne servent pour l'instant que de repère visuel, et ne sont pas utilisées à des fins d'optimisation.

Au point de vue technique, l'utilisation de différents langages de programmation et de différentes syntaxes pour coder l'interface d'interaction manuelle, de même que les fonctionnalités de traitement d'image et les modélisations du graphe, serait avantageuse. En effet, si cette interface doit être utilisée de façon routinière pour corriger des réseaux vasculaires segmentés, ou bien simplement pour les observer et les étudier dans une perspective de recherche scientifique liée à la structure d'un réseau vasculaire ou à la modélisation du couplage neurovasculaire, il serait avantageux d'avoir une interface plus rapide, d'exploiter des modules établis de traitement d'image et de visualisation (ITK, VTK) et des bibliothèques de modélisation des graphes et de FEM. Une interface plus intelligente, plus rapide, et plus ergonomique serait avantageuse. L'intégration en temps réel de mesures de perfusions ou de calcul de débit sanguin serait un ajout intéressant puisqu'on pourrait alors avoir une estimation au fur et à mesure de la perfusion dans le cerveau ; ce qui pourrait indiquer des régions à réviser (si on constate des régions de tissus sous-perfusés).

Pour résumer, l'interface *GraphCorrectionGUI* développée au cours de ce projet permet d'interagir avec les graphes de la microvasculature. Les principales fonctionnalités imposées par les types d'erreurs de vectorisation rencontrés sont présentes dans cette interface. Les principales limitations concernent l'automatisation et la rapidité de l'outil. La forme modulable adoptée pour cette interface permet l'ajout rapide de nouvelles fonctionnalités. Les autres solutions proposées sont des propositions techniques pour accroître la rapidité de correction et l'automatisation de la

méthode. En effet, à long terme toutes les étapes de correction manuelle devraient être faites de façon automatique, car l'avènement des microscopes à coupes histologiques robotisés nécessitera l'application de ces techniques sur des volumes beaucoup plus volumineux, ce qui rend pratiquement infaisable la supervision de la segmentation pour chaque parcelle de volume.

5.3 Discussion sur les résultats et leur signification

Il a été montré dans la section résultat que seuls 6 graphes ont été nettoyés à ce jour, et que le faible nombre d'échantillons dans chacun des groupes empêche de tirer des conclusions significatives quant à l'effet du vieillissement sur la microvasculature du néocortex. En plus de cette limitation de l'analyse, quelques informations supplémentaires doivent être considérées pour bien comprendre la signification des résultats obtenus ou qui seront obtenus à partir de ces angiographies.

D'abord, le modèle animal utilisé lors de cette étude n'est peut-être pas le mieux adapté et le plus représentatif de la microvasculature du néocortex humain et de son évolution au cours du vieillissement. L'écart d'âge entre les groupes jeunes et âgés est assez important, et les stades de développement correspondent approximativement au début de l'adolescence et au début de la sénescence pour l'être humain. Également, un effet pouvant influencer les résultats est le fait que plusieurs tumeurs aient été observées dans le cerveau des rats âgés durant les expériences (8 rats âgés sur 12 présentaient des masses visibles, vs 0 sur 12 pour les rats jeunes). Ceci témoigne du fait que le groupe âgé était en fin de vie, et d'autre part soulève la question de l'influence potentielle des modifications de vasculatures liées aux masses tumorales versus l'effet normal du vieillissement. De plus, ces mesures ne sont pas accompagnées d'évaluation de marqueurs indépendants du vieillissement du cerveau, par exemple des effets cognitifs. Il est donc difficile de cibler d'une part si les variations observées sont dues au vieillissement, et d'autres parts si ces modifications ont des effets sur la fonction des tissus dans lesquels les vaisseaux se trouvent. Une façon d'améliorer cet aspect du protocole expérimental serait d'effectuer des tests neuropsychologiques ou des mesures d'imagerie fonctionnelle du cerveau pour trouver la corrélation entre les modifications de la vasculature et les modifications de fonctions cognitives. Une imagerie en parallèle de la matière blanche et des vaisseaux sanguins pourrait aussi permettre de vérifier la corrélation entre les neurodégénérescences et les dégénérescences

vasculaires. Il serait également intéressant de s'assurer avec plus de précautions que le modèle animal utilisé est représentatif du vieillissement humain du cerveau.

La comparaison de 2 groupes d'âge différents peut mener à des ambiguïtés au point de vue des résultats, car il est difficile de déterminer si les différences observées sont dues à une évolution de la vasculature au cours du temps, ou bien si c'est dû à d'autres facteurs confondants. En d'autres mots, les mesures pour chacun des groupes sont en quelque sorte un cliché à un moment donné des VANs du néocortex. On peut faire des mesures sur ces clichés pour connaître leur différence, mais rien n'indique que les différences constatées sont effectivement dues au vieillissement (hormis les conditions expérimentales imposées). Pour améliorer cet aspect de la méthodologie, il faudrait utiliser plus de 2 cohortes de rats d'âge différents pour observer la progression d'une même mesure plutôt que la différence entre 2 états, sans être sûr de son évolution au cours du temps. L'approche réductionniste présentée ici est à considérer avec précaution. L'étude du réseau vasculaire sans observer les interactions complexes de ce système avec le réseau de cellules gliales, les neurones et toutes les réactions neurophysiologiques présente le risque de simplifier les observations uniquement en termes d'effet de causalité lié à la neurovasculature alors que toutes modifications des vaisseaux sanguins pourraient aussi être un effet secondaire de modifications à d'autres niveaux de ce réseau d'interactions. Une façon de procéder serait de mesurer lors d'une même expérience la position du noyau des neurones, des astrocytes et les vaisseaux à l'aide de fluorophore de longueur d'onde différente (Tsai et al., 2009). En acquérant de l'information sur la position des neurones il est possible de mieux comprendre le contexte dans lequel est placée la microvasculature.

Le nombre de rats pour chaque groupe est faible, et parmi ces échantillons la qualité des angiographies varie grandement d'une expérience à l'autre. Il faut également noter que les angiographies n'ont pas été acquises durant les expériences dans le but précis d'en extraire la vasculature. Elles servaient plutôt de repère pour choisir les endroits où les numérisations linéaires devaient être fait. Ceci entraîne que les caractéristiques des angiographies n'ont pas été choisies selon une méthode précise. On peut alors se demander à juste titre si les vasculatures qui sont extraites de ces volumes sont des échantillons statistiquement indépendants ou bien si des biais existent. Par exemple, les angiographies pour tous les vieux rats ont été acquises en premier alors que celles des jeunes rats ont été acquises dans un second bloc ultérieur. Est-ce que la plus grande variabilité observée pour certaines mesures de graphe et la qualité des angiographies

dépendent de cet ordre temporel des mesures ? En d'autres mots, la meilleure qualité des angiographies pour les jeunes rats est-elle un effet du vieillissement, ou est simplement dues à l'expertise accumulée quant aux procédures des expériences ? Il serait intéressant de faire des comparaisons statistiques considérant plusieurs variables (comme la date de l'expérience, l'expérimentateur, l'âge de l'animal) en plus des mesures physiologiques pour s'assurer que les conditions expérimentales ne sont pas la cause principale des variations constatées. Un ajustement du protocole expérimental pour s'assurer d'une indépendance des mesures par rapport aux conditions expérimentales serait également important. Aussi, en ajustant le protocole pour que les angiographies respectent des critères prédéfinis, on pourra s'assurer d'une certaine cohérence dans les caractéristiques des angiographies, ce qui facilitera la mise en place d'une méthode de segmentation reproductible et fiable. Une autre façon de procéder serait d'extraire les cerveaux après les mesures *in vivo* et de mesurer leur vasculature en détail pour l'ensemble de l'organe à l'aide d'un microscope à histologie robotisé, comme le font (Oh et al., 2014). De cette façon, on augmente la taille des angiographies de façon significative et la vasculature étudiée n'est plus limitée au volume effectif observable par microscopie 2-photons.

Finalement, le fondement de ce projet est l'explication des phénomènes microvasculaires dans le but de mieux comprendre les variations observées par imagerie clinique (telle que l'IRM BOLD) à l'échelle macrométrique. Pour ce faire, il serait nécessaire de modéliser l'impact des variations de la microvasculature sur des mesures IRM (Gagnon & Sakadzic, 2014). Faire varier un réseau vasculaire de base en modifiant de façon synthétique la topologie du réseau pourrait permettre d'identifier la signature de certains types de changement des vaisseaux sur les mesures d'IRM BOLD. Ce type d'étude pourrait s'accompagner de mesures *in vivo* de l'effet de microocclusions sur la répartition du débit sanguin (Schaffer et al., 2006). Il sera alors possible de relier les observations microscopiques à des mesures macroscopiques, et éventuellement d'identifier de nouveaux biomarqueurs du vieillissement de la microvasculature du cerveau.

CONCLUSION

L'objectif principal de ce projet de recherche était de développer une méthode de segmentation permettant d'extraire le réseau vasculaire d'angiographies acquises par microscopie à fluorescence 2-photons. Les angiographies de la microvasculature du néocortex de rats ont été mesurées dans le cadre d'une étude s'intéressant à l'effet du vieillissement du cerveau sur la dynamique vasculaire. L'approche de segmentation adoptée utilise les mesures d'intensité et de similarité à un vaisseau sanguin pour créer un masque de la vasculature dans le volume. Ensuite, ce masque est transformé en graphe à l'aide d'un algorithme de squelettisation 3D. Cette façon de procéder permet de trouver le centre de la plupart des vaisseaux sanguins du volume. Il demeure tout de même une certaine quantité d'erreurs qui nécessitent une intervention manuelle afin de les corriger. Les principales erreurs observées suite à la segmentation automatique des vasculatures sont l'apparition de vaisseaux superflus, des erreurs de positionnement de vaisseau et l'apparition de quelques trous dans le réseau vasculaire. Pour corriger les graphes, une interface graphique MATLAB a été développée, *GraphCorrectionGUI*. Cette interface permet d'utiliser une série de critères basée sur les propriétés des vaisseaux pour repérer les vaisseaux à enlever, et les portions du volume où de nouveaux segments doivent être ajoutés à la main pour compléter le graphe de la vasculature. Les méthodes développées au cours de ce projet ont été utilisées pour segmenter la microvasculature de 2 cohortes de rats afin d'identifier l'effet du vieillissement sur la morphologie du réseau vasculaire. Une analyse préliminaire des masques de la vasculature a révélé une baisse significative de la densité des capillaires avec l'âge. L'analyse plus en profondeur des réseaux vasculaires à partir de leur graphe est en cours, et à ce jour les graphes de 6 rats ont été nettoyés (4 jeunes et 2 vieux rats). La pertinence des outils de correction manuelle a pu être constatée en comparant les caractéristiques des graphes non nettoyés avec les celles des 6 graphes terminés. Le faible nombre de graphes achevés empêche de tirer des conclusions sur l'effet du vieillissement sur la structure de la microvasculature, bien qu'on semble voir une baisse de la densité linéaire des capillaires (lié à la perfusion) pour les rats âgés.

Les principales limitations de la méthode développée au cours de ce projet résident dans l'hypothèse que le masque de la vasculature obtenu par seuil d'intensité et par identification des structures tubulaires ne contient pas d'erreur, alors que diverses sources de variabilité peuvent influencer les résultats de segmentation. Ceci a pour conséquence que de nombreux segments doivent être retirés du graphe, et d'autres encore doivent être tracés à la main. Le processus de

nettoyage des vasculatures est long et fastidieux et représente le principal goulot d'étranglement limitant la rapidité et l'efficacité de cette méthode. D'autres parts, le projet est limité par la variabilité des caractéristiques des angiographies, certaines présentant une grande quantité de bruit, d'autres pour lesquelles les vaisseaux à la surface masquent par ombrage les capillaires qu'ils couvrent, etc. La méthode déterministe adoptée lors de ce projet n'est peut-être pas la mieux adaptée au type de donnée contenu dans les angiographies. Finalement, la faible quantité d'angiographie complètement vectorisée représente une limitation importante du projet, car cela limite le niveau de confiance face aux mesures réalisées sur les graphes et empêche de tirer des conclusions statistiquement significatives. Néanmoins, les méthodes développées durant ce projet sont fonctionnelles et sont présentement utilisées pour compléter l'analyse des graphes restants.

Lors de la discussion, plusieurs avenues ont été proposées pour la suite de ce projet afin d'améliorer les performances de la méthode de segmentation et pour accélérer le processus de nettoyage des réseaux vasculaires. Certaines de ces améliorations sont (1) l'utilisation de méthodes stochastiques ou d'évolution de surface pour améliorer le masque des vaisseaux sanguins et ainsi réduire la quantité d'erreurs dans le graphe de la vasculature, (2) l'ajout de fonctions de suivi de vaisseau sanguin, de fermeture de trous automatiques et de critères de sélections basés sur l'apprentissage machine afin d'accélérer le nettoyage des graphes. Ces quelques améliorations auraient pour but de rendre la méthode développée au cours de ce projet plus autonome et moins sensible au bruit, ce qui est essentiel pour utiliser ces outils dans une étude plus importante (plusieurs groupes d'âge) ou pour segmenter des volumes plus imposants (Cerveau entier acquis par un microscope à coupe histologique robotisé.).

À court termes, les prochaines étapes de ce projet sont l'achèvement de l'analyse des vasculatures restante, la comparaison des graphes achevés pour attester l'effet du vieillissement sur la microvasculature du cerveau, la modélisation de l'effet de perturbations de la microstructure du réseau vasculaire sur le débit sanguin et sur les mesures IRM BOLD acquises pour le volume entier, et la comparaison de ces variations modélisées avec des mesures d'occlusions réalisées *in vivo*. Un article scientifique réunissant les résultats obtenus durant ce projet et une description de la méthode de segmentation employée est en cours de préparation et sera soumis pour publication à la fin du mois d'août 2014.

BIBLIOGRAPHIE

- Aanerud, J., Borghammer, P., Chakravarty, M. M., Vang, K., Rodell, A. B., Jónsdóttir, K. Y., ... Gjedde, A. (2012). Brain energy metabolism and blood flow differences in healthy aging. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(7), 1177–87. doi:10.1038/jcbfm.2012.18
- Allen, K., Yau, C., & Noble, J. (2008). A recursive, stochastic vessel segmentation framework that robustly handles bifurcations. *Conference on Medical Image Understanding and ...*, 1(i), 2–6. Retrieved from <http://www.computing.dundee.ac.uk/staff/jessehoey/MIUA2008Proceedings/papers/KAllenMIUAFinal.pdf>
- Ances, B. M., Liang, C. L., Leontiev, O., Perthen, J. E., Fleisher, A. S., Lansing, A. E., & Buxton, R. B. (2009). Effects of aging on cerebral blood flow, oxygen metabolism, and blood oxygenation level dependent responses to visual stimulation. *Human Brain Mapping*, 30(4), 1120–1132. doi:10.1002/hbm.20574.Effects
- Badea, C., & Drangova, M. (2008). In vivo small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography. *Physics in Medicine ...*, 53(19), 1–36. doi:10.1088/0031-9155/53/19/R01.In
- Baraghis, E., Bolduc, V., Lefebvre, J., Srinivasan, V. J., Boudoux, C., Thorin, E., & Lesage, F. (2011). Measurement of cerebral microvascular compliance in a model of atherosclerosis with optical coherence tomography. *Biomed. Opt. Express*, 2(11), 3079–3093. doi:10.1364/BOE.2.003079
- Bellec, P., Lavoie-Courchesne, S., Dickinson, P., Lerch, J. P., Zijdenbos, A. P., & Evans, A. C. (2012). The pipeline system for Octave and Matlab (PSOM): a lightweight scripting framework and execution engine for scientific workflows. *Frontiers in Neuroinformatics*, 6(April), 7. doi:10.3389/fninf.2012.00007

- Benmansour, F., & Cohen, L. D. (2010). Tubular Structure Segmentation Based on Minimal Path Method and Anisotropic Enhancement. *International Journal of Computer Vision*, 92(2), 192–210. doi:10.1007/s11263-010-0331-0
- Bentourkia, M., Bol, A., Ivanoiu, A., Labar, D., Sibomana, M., Coppens, A., ... De Volder, A. G. (2000). Comparison of regional cerebral blood flow and glucose metabolism in the normal brain: effect of aging. *Journal of the Neurological Sciences*, 181(1-2), 19–28. doi:10.1016/S0022-510X(00)00396-8
- Blinder, P., & Shih, A. (2010). Topological basis for the robust distribution of blood to rodent neocortex. *PNAS*, 107(28), 12670–12675. doi:10.1073/pnas.1007239107/-/DCSupplemental. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1007239107
- Blum, H. (1967). A transformation for extracting new descriptors of shape. In W. Wathen-Dunn (Ed.), *Models for the Perception of Speech and Visual Form* (pp. 362–380). Cambridge, MA: MIT Press. Retrieved from <http://pageperso.lif.univ-mrs.fr/~edouard.thiel/rech/1967-blum.pdf>
- Boas, D. a, Jones, S. R., Devor, A., Huppert, T. J., & Dale, A. M. (2008). A vascular anatomical network model of the spatio-temporal response to brain activation. *NeuroImage*, 40(3), 1116–29. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.12.061
- Buxton, R. B. (2010). Interpreting oxygenation-based neuroimaging signals: the importance and the challenge of understanding brain oxygen metabolism. *Frontiers in Neuroenergetics*, 2(June), 8. doi:10.3389/fnene.2010.00008
- Buxton, R. B., Uludağ, K., Dubowitz, D. J., & Liu, T. T. (2004). Modeling the hemodynamic response to brain activation. *NeuroImage*, 23 Suppl 1, S220–33. doi:10.1016/j.neuroimage.2004.07.013
- Chen, S., & Leung, H. (2004). Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *Journal of Electronic Imaging*, 13(1), 220. doi:10.1117/1.1631316

- Cloft, H. J., & Kallmes, D. F. (2003). Detection and characterization of very small cerebral aneurysms by using 2D and 3D helical CT angiography. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 24(1), 154; author reply 154–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12533352>
- Demirkaya, S., Uluc, K., Bek, S., & Vural, O. (2008). Normal blood flow velocities of basal cerebral arteries decrease with advancing age: a transcranial Doppler sonography study. *The Tohoku Journal of Experimental ...*, 214(2), 145–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285672>
- Desjardins, M., Berti, R., Lefebvre, J., Dubeau, S., & Lesage, F. (2014). Aging-related differences in cerebral capillary blood flow in anesthetized rats. *Neurobiology of Aging*, 35(8), 1947–1955. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.136
- Devor, A., Boas, D. A., Einevoll, G. T., Buxton, R. B., & Dale, A. M. (2012). Neuronal Basis of Non-Invasive Functional Imaging: From Microscopic Neurovascular Dynamics to BOLD fMRI. In I.-Y. Choi & R. Gruetter (Eds.), *Neural Metabolism In Vivo* (Vol. 4, pp. 433–500). Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4614-1788-0
- Drechsler, K., & Laura, C. (2010). Comparison of vesselness functions for multiscale analysis of the liver vasculature. ... in *Biomedicine (ITAB), 2010 10th IEEE ...*. Retrieved from http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=5687627
- Dubeau, S., Desjardins, M., Pouliot, P., Beaumont, E., Gaudreau, P., Ferland, G., & Lesage, F. (2011). Biophysical model estimation of neurovascular parameters in a rat model of healthy aging. *NeuroImage*, 57(4), 1480–91. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.04.030
- Dubeau, S., Ferland, G., & Gaudreau, P. (2011). Cerebrovascular hemodynamic correlates of aging in the Lou/c rat: A model of healthy aging. *Neuroimage*, 56(4), 1892–901. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.03.076
- Enquobahrie, A., & Ibanez, L. (2007). Vessel enhancing diffusion filter. *The Insight Journal*, 1–14. Retrieved from <http://www.insight-journal.com/download/pdf/6321/VEDArticle2.pdf>

- Fang, Q., Sakadžić, S., Ruvinskaya, L., Devor, A., Dale, A. M., & Boas, D. a. (2008). Oxygen advection and diffusion in a three- dimensional vascular anatomical network. *Optics Express*, 16(22), 17530–41. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2584207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Farkas, E., & Luiten, P. G. . (2001). *Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease*. *Progress in Neurobiology* (Vol. 64, pp. 575–611). doi:10.1016/S0301-0082(00)00068-X
- Frangi, A., & Niessen, W. (1998). Multiscale vessel enhancement filtering. ... *Image Computing and ...*, 1496, 130–137. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/a57784628587870p.pdf>
- Friman, O., Hindennach, M., Kühnel, C., & Peitgen, H.-O. (2010). Multiple hypothesis template tracking of small 3D vessel structures. *Medical Image Analysis*, 14(2), 160–71. doi:10.1016/j.media.2009.12.003
- Gagnon, L., & Sakadzic, S. (2014). Underpinning the microvascular origin of BOLD-fMRI with two-photon microscopy. *Biomedical Optics*, 4, BT4A–1. Retrieved from <http://www.opticsinfobase.org/abstract.cfm?uri=BIOMED-2014-BT4A.1>
- Girouard, H., & Iadecola, C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of Applied Physiology*, 10021, 328–335. doi:10.1152/japplphysiol.00966.2005.
- Gooya, A., Liao, H., & Sakuma, I. (2012). Generalization of geometrical flux maximizing flow on Riemannian manifolds for improved volumetric blood vessel segmentation. *Computerized Medical Imaging and Graphics : The Official Journal of the Computerized Medical Imaging Society*, 36(6), 474–83. doi:10.1016/j.compmedimag.2012.04.007
- Hildebrand, T., & Rügsegger, P. (1997). A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *Journal of Microscopy*, 185(1), 67–75. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2818.1997.1340694.x/abstract>

- Hu, S., & Wang, L. V. (2010). Neurovascular photoacoustic tomography. *Frontiers in Neuroenergetics*, 2(June), 10. doi:10.3389/fnene.2010.00010
- Huijts, M., Duits, A., van Oostenbrugge, R. J., Kroon, A. a, de Leeuw, P. W., & Staals, J. (2013). Accumulation of MRI Markers of Cerebral Small Vessel Disease is Associated with Decreased Cognitive Function. A Study in First-Ever Lacunar Stroke and Hypertensive Patients. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5(November), 72. doi:10.3389/fnagi.2013.00072
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(5), 347–60. doi:10.1038/nrn1387
- Kapur, J., Sahoo, P., & Wong, A. (1985). A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 29(3), 273–285. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0734189X85901252>
- Kaufhold, J. P., Tsai, P. S., Blinder, P., & Kleinfeld, D. (2012). Vectorization of optically sectioned brain microvasculature: Learning aids completion of vascular graphs by connecting gaps and deleting open-ended segments. *Medical Image Analysis*. doi:10.1016/j.media.2012.06.004
- Kirbas, C. (Wallace-K. N. I., & Quek, F. (Virginia T. U. (2004). A review of vessel extraction techniques and algorithms. *ACM Computing Surveys*, 36(2), 81–121. doi:10.1145/1031120.1031121
- Kleinfeld, D., Bharioke, A., Blinder, P., Bock, D. D., Briggman, K. L., Chklovskii, D. B., ... Sakmann, B. (2011). Large-scale automated histology in the pursuit of connectomes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(45), 16125–38. doi:10.1523/JNEUROSCI.4077-11.2011
- Lacoste, C., Finet, G., & Magnin, I. E. (2006). Coronary Tree Extraction from X-Ray Angiograms Using Marked Point Processes. *3rd IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: Macro to Nano, 2006.*, (1), 157–160. doi:10.1109/ISBI.2006.1624876

- Law, M., & Chung, A. (2008). Three dimensional curvilinear structure detection using optimally oriented flux. In *Computer Vision–ECCV 2008* (pp. 368–382). Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-88693-8_27
- Lee, T.-C., Kashyap, R. L., & Chu, C.-N. (1994). Building skeleton models via 3-D medial surface/axis thinning algorithms. *CVGIP: Graphical Models and Image Processing*, 56(6), 462–478. Retrieved from <https://sci.utah.edu/devbuilds/biomesh3d/FEMesher/references/lee94-3dskeleton.pdf>
- Leenders, K., Perani, D., & Lammertsma, A. (1990). Cerebral blood flow, blood volume and oxygen utilization normal values and effect of age. *Brain*, 113(1), 27–47. doi:10.1093/brain/113.1.27
- Lesage, D., Angelini, E. D., Bloch, I., & Funka-Lea, G. (2009). A review of 3D vessel lumen segmentation techniques: models, features and extraction schemes. *Medical Image Analysis*, 13(6), 819–45. doi:10.1016/j.media.2009.07.011
- Li, C., & Tam, P. (1998). An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition Letters*, 19(8), 771–776.
- Lindeberg, T. (1994). Scale-space theory: A basic tool for analyzing structures at different scales. *Journal of Applied Statistics*. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/757582976>
- Lorthois, S., Lauwers, F., & Cassot, F. (2014). Tortuosity and other vessel attributes for arterioles and venules of the human cerebral cortex. *Microvascular Research*, 91, 99–109. doi:10.1016/j.mvr.2013.11.003
- Lou, Y., Xia, J., & Wang, L. V. (2014). Mouse brain imaging using photoacoustic computed tomography, 8943, 894340. doi:10.1117/12.2039669
- Lynch, C. D., Cooney, P. T., Bennett, S. a, Thornton, P. L., Khan, a S., Ingram, R. L., & Sonntag, W. E. (1999). Effects of moderate caloric restriction on cortical microvascular density and

- local cerebral blood flow in aged rats. *Neurobiology of Aging*, 20(2), 191–200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10537028>
- Manniesing, R., Viergever, M. A., & Niessen, W. J. (2006). Vessel enhancing diffusion: a scale space representation of vessel structures. *Medical Image Analysis*, 10(6), 815–25. doi:10.1016/j.media.2006.06.003
- Masters, B. R., & So, P. T. C. (2008). *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy* (p. 860). New York, NY, USA: Oxford University Press.
- Mitschelen, M., Garteiser, P., Carnes, B. a, Farley, J. a, Doblas, S., Demoe, J. H., ... Sonntag, W. E. (2009). Basal and hypercapnia-altered cerebrovascular perfusion predict mild cognitive impairment in aging rodents. *Neuroscience*, 164(3), 918–28. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.070
- Nimmerjahn, A., & Helmchen, F. (2012). In vivo labeling of cortical astrocytes with sulforhodamine 101 (SR101). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012(3), 326–34. doi:10.1101/pdb.prot068155
- Oh, S. W., Harris, J. a., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., ... Zeng, H. (2014). A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 508(7495), 207–214. doi:10.1038/nature13186
- Pantoni, L. (2010). Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurology*, 9(7), 689–701. doi:10.1016/S1474-4422(10)70104-6
- Prince, J., & Links, J. (2006). *Medical imaging signals and systems* (p. 480). Pearson Prentice Hall. Retrieved from [http://www.just.edu.jo/FacultiesandDepartments/FacultyofEngineering/Departments/BiomedicalEngineering/Documents/bme 561.pdf](http://www.just.edu.jo/FacultiesandDepartments/FacultyofEngineering/Departments/BiomedicalEngineering/Documents/bme%20561.pdf)
- Rheault, S. (2010). *Portrait social du Québec : Données et analyses*. (S. Rheault, Ed.) (p. 311). Québec, Qc: Institut de la statistique du Québec.

- Riddle, D. R. (2007). *Brain aging: models, methods, and mechanisms*. CRC Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1834/>
- Rincon, F., & Wright, C. B. (2014). Current pathophysiological concepts in cerebral small vessel disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(March), 24. doi:10.3389/fnagi.2014.00024
- Risser, L., Plouraboue, F., & Descombes, X. (2008). Gap filling of 3-D microvascular networks by tensor voting. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 27(5), 674–87. doi:10.1109/TMI.2007.913248
- Rosengarten, B., Aldinger, C., Spiller, a., & Kaps, M. (2003). Neurovascular Coupling Remains Unaffected During Normal Aging. *Journal of Neuroimaging*, 13(1), 43–47. doi:10.1177/1051228402239716
- Sakadzic, S., Mandeville, E. T., Gagnon, L., Musacchia, J. J., Yaseen, M. A., Yucel, M. A., ... Boas, D. A. (2014). High-Resolution Optical Microscopy Imaging of Cortical Oxygen Delivery and Consumption. In *CLEO: 2014* (p. AF2B.3). Washington, D.C.: OSA. doi:10.1364/CLEO_AT.2014.AF2B.3
- Sato, Y., Nakajima, S., Shiraga, N., Atsumi, H., Yoshida, S., Koller, T., ... Kikinis, R. (1998). Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images. *Medical Image Analysis*, 2(2), 143–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10646760>
- Schaffer, C. B., Friedman, B., Nishimura, N., Schroeder, L. F., Tsai, P. S., Ebner, F. F., ... Kleinfeld, D. (2006). Two-photon imaging of cortical surface microvessels reveals a robust redistribution in blood flow after vascular occlusion. *PLoS Biology*, 4(2), e22. doi:10.1371/journal.pbio.0040022
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–82. doi:10.1038/nmeth.2019

- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), 624–630.
- Shih, A. Y., Driscoll, J. D., Drew, P. J., Nishimura, N., Schaffer, C. B., & Kleinfeld, D. (2012). Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(7), 1277–309. doi:10.1038/jcbfm.2011.196
- Siddiqi, K., & Pizer, S. (2008). *Medial representations: mathematics, algorithms and applications*. (K. (McGill U. Siddiqi & S. M. (University of N. C. Pizer, Eds.). Springer Science. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=ko3OLZneUIQC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Medial+Representations+Mathematics,+Algorithms+and+Applications&ots=bAQRyk8iyg&sig=FVpJu1POTD6L_3-Ui76YLQRuzUg
- Sonntag, W. E., Lynch, C. D., Cooney, P. T., & Hutchins, P. M. (1997). Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology*, 138(8), 3515–20. doi:10.1210/endo.138.8.5330
- Srinivasan, V. J., Atochin, D. N., Radhakrishnan, H., Jiang, J. Y., Ruvinskaya, S., Wu, W., ... Boas, D. a. (2011). Optical coherence tomography for the quantitative study of cerebrovascular physiology. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(6), 1339–45. doi:10.1038/jcbfm.2011.19
- Tsai, P. S., Kaufhold, J. P., Blinder, P., Friedman, B., Drew, P. J., Karten, H. J., ... Kleinfeld, D. (2009). Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(46), 14553–70. doi:10.1523/JNEUROSCI.3287-09.2009

- Tyrrell, J., Tomaso, E. di, & Fuja, D. (2007). Robust 3-D modeling of vasculature imagery using superellipsoids. *Medical Imaging*, ..., 26(2), 223–237. doi:10.1109/TMI.2006.889722
- Wang, N., Chen, W., & Feng, Q. (2013). Angiogram Images Enhancement Method Based on GPU. In M. Long (Ed.), *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, IFMBE Proceedings Vol. 39* (pp. 868–871).
- Wang, L. V., & Wu, H.-I. (2007). *Biomedical Optics: Principles and Imaging* (p. 362). Hoboken, NJ, USA: Wiley Interscience.
- Xu, M., & Wang, L. V. (2006). Photoacoustic imaging in biomedicine. *Review of Scientific Instruments*, 77(4), 041101. doi:10.1063/1.2195024
- Yao, J., Xia, J., Maslov, K. I., Nasiriavanaki, M., Tsytarev, V., Demchenko, A. V., & Wang, L. V. (2013). Noninvasive photoacoustic computed tomography of mouse brain metabolism in vivo. *NeuroImage*, 64, 257–66. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.08.054
- Zepeda, A., Arias, C., & Sengpiel, F. (2004). Optical imaging of intrinsic signals: recent developments in the methodology and its applications. *Journal of Neuroscience Methods*, 136(1), 1–21. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.02.025
- Zhang, H., Fritts, J. E., & Goldman, S. a. (2008). Image segmentation evaluation: A survey of unsupervised methods. *Computer Vision and Image Understanding*, 110(2), 260–280. doi:10.1016/j.cviu.2007.08.003
- Zhang, R., Kadar, T., Sirimanne, E., MacGibbon, A., & Guan, J. (2012). Age-related memory decline is associated with vascular and microglial degeneration in aged rats. *Behavioural Brain Research*, 235(2), 210–7. doi:10.1016/j.bbr.2012.08.002
- Zhang, Y., Peng, Y., Chen, G., & Chen, W. (2010). Cerebral blood flow, cerebral blood volume, oxygen utilization and oxygen extraction fraction: the influence of age. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao = Journal of Southern Medical University*, 30(6), 1237–9. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/20584645>

ANNEXE A – FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

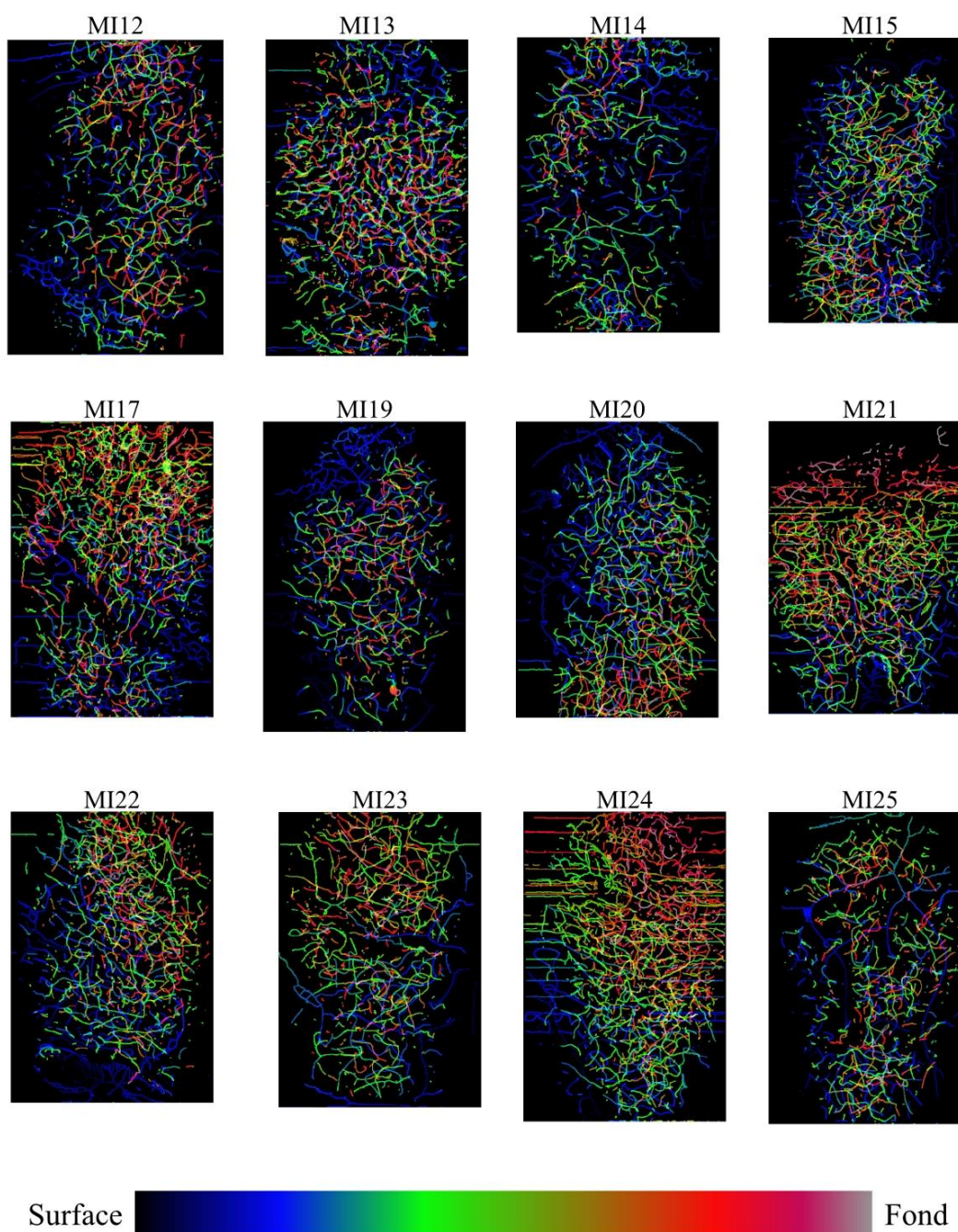


Figure A.1 Projections de l'intensité maximale codée en couleur pour les squelettes des angiographies des rats âgés. Les squelettes sont obtenus directement à partir de la segmentation de la vasculature réalisée lors du prétraitement des données.