

**Titre:** Développement d'un système de tomographie optique laminaire  
Title: pour application à l'imagerie de la moelle épinière du petit animal

**Auteur:** Nicolas Ouakli  
Author:

**Date:** 2009

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Ouakli, N. (2009). Développement d'un système de tomographie optique laminaire pour application à l'imagerie de la moelle épinière du petit animal  
Citation: [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
<https://publications.polymtl.ca/192/>

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

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/192/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Frédéric Lesage  
Advisors:

**Programme:** Génie biomédical  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME DE  
TOMOGRAPHIE OPTIQUE LAMINAIRE POUR  
APPLICATION À L'IMAGERIE DE LA MOELLE  
ÉPINIÈRE DU PETIT ANIMAL

NICOLAS OUAKLI  
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE BIOMÉDICAL)  
NOVEMBRE 2009

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME DE TOMOGRAPHIE OPTIQUE LAMINAIRE  
POUR APPLICATION À L'IMAGERIE DE LA MOELLE ÉPINIÈRE DU PETIT  
ANIMAL

présenté par : OUAKLI Nicolas

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées  
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. SAVARD Pierre, Ph.D., président

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

M. LINA Jean-Marc, Ph.D., membre

## DÉDICACE

*À mes parents qui m'ont toujours soutenu  
ainsi que tous mes proches où qu'ils soient  
sur la planète.*

## REMERCIEMENTS

Je souhaiterais remercier plusieurs personnes qui m'ont apporté leur soutien au cours de ce projet. Entre autres, les personnes qui m'ont dirigé, avec qui j'ai collaboré, qui m'ont encouragé et supporté tout au long de ce travail de maîtrise.

Je tiens avant tout à témoigner mon entière reconnaissance à mon directeur de recherche M. FRÉDÉRIC LESAGE qui a cru en moi et n'a pas hésité à m'attribuer un projet d'une si grande envergure avec autant de responsabilités au cours de ces deux dernières années, pour m'avoir dirigé, conseillé et surtout encouragé dans les temps les plus durs, pour tous les moments enrichissants partagés en sa compagnie, pour m'avoir apporté une vision unique de la recherche académique et surtout pour tout ce que j'ai pu apprendre sur moi-même grâce à lui.

Je remercie M. PIERRE SAVARD pour avoir accepté de présider ma soutenance de mémoire et M. JEAN-MARC LINA pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de soutenance.

Mes remerciements vont à l'École Polytechnique de Montréal qui a accepté ma candidature pour cet échange de double diplôme, ainsi que mon institution française l'École Centrale Marseille qui m'a permis de vivre cette expérience à l'international. Je remercie le service des relations internationales de l'ECM en les personnes de Mme EMMY ARTS et Mme MARIANNE GONSSARD qui ont tout fait pour me faciliter la vie concernant les formalités administratives et qui ont toujours défendu ma cause. Merci à Mmes PASCALE BORCHI, FRANÇOISE DUPRAT, MIREILLE COMMANDRE, CAROLE DEUMIE, MM. DIDIER NUEL, FABIEN LEMARCHAND, ARNAUD GUILLIN, GEORGES BERARDI et PIERRE CHIRI qui ont tous contribué à ma participation à cette grande aventure en m'apportant leur soutien de diverses façons quand j'en avais le plus besoin.

Je voudrais remercier mes amis, collègues de travail, collaborateurs et étudiants de laboratoire de l'EPM pour avoir supporté mon caractère bien trempé et mon tempérament soupe au lait en tout temps durant ces deux années. Je remercie tout particulièrement Simon Dubeau qui m'a beaucoup aidé dans la phase initiale du projet, Éric Beaumont qui a

préparé les chirurgies des animaux et enfin Edgar Guevara-Codina sans qui tous les objectifs et résultats très prometteurs de ce projet n'auraient jamais pu être atteints. Merci à Carl Matteau-Pelletier, Mathieu Dehaes, Simon Archambault, Michèle Desjardins, Louis Gagnon, Nicolas Brieu, Alexis Machado, Maxime Abran, Samuel Bélanger, Li Baoqiang, Estelle Breton, Edward Baraghis et Karim Zerouali pour tous les bons moments partagés en leur compagnie.

Remerciements à mes amis Alicia, Jean-Yves, Brice, Célia, Amélie, Jérémie, David P., Emeric, Alex V., Mathieu, Jej, Dodu, La Burne, Axel, Nana, Mael, Rémi, Clémence, Jérôme, Aurélie Brug, Nico P., Marie, toute la Spécial, tout le BDS 2006/2007, les promo 2008 et 2009, tous les gars du rugby ainsi que tous les copains de Nîmes et d'Alès.

Merci à Bennie, Charlie et Daffie qui m'ont fourni tous mes résultats.

Je tiens aussi à remercier la bande de comiques du Service Canadien du Renseignement de Sécurité pour leurs compétences hors du commun, la perte de temps occasionnée mais surtout pour me permettre d'avoir une histoire bien marrante à raconter à mon entourage.

Je ne remercierai jamais assez mes parents Lydie et Chérif qui ont toujours cru en moi, qui m'ont toujours assumé financièrement et qui m'ont permis d'atteindre un tel niveau d'étude.

Pour terminer, je souhaite remercier tous les gens qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce mémoire et aussi toutes les personnes que je ne cite pas mais auxquelles je pense chaque jour.

## RÉSUMÉ

Plusieurs modalités d'imagerie fonctionnelle, telles que l'Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle, l'Optique Diffuse ou l'Optique Intrinsèque, ont été développées afin de quantifier l'activité présente dans les tissus neuronaux. Bien qu'elles aient été largement appliquées sur le cortex, leur application à la moelle épinière est plutôt rare. Les difficultés physiologiques et anatomiques telles que le mouvement respiratoire, la petite taille, la présence d'inhomogénéités magnétiques et l'inversion entre matière grise et matière blanche comparé au cerveau rendent les techniques d'imagerie neuronale usuelles déficientes. La Tomographie Optique Laminaire (TOL) est une technique récemment développée qui comble le vide entre l'imagerie optique intrinsèque et l'imagerie optique diffuse. Son principe est fondé sur le balayage d'une source lumineuse et de détecteurs à la surface du tissu imagé. En utilisant des distances de séparation source-détecteur différentes, la lumière qui se propage dans les tissus peut être distinguée de celle qui émerge de la surface fournissant ainsi de la sensibilité en profondeur.

Ce travail de maîtrise proposait de développer un système de Tomographie Optique Laminaire en vue de l'appliquer à l'imagerie de l'activité neuronale de la moelle épinière du rat. Après la phase de conception, des acquisitions sur différents fantômes ont permis de caractériser les performances du système ainsi que de valider sa stabilité et sa robustesse.

Finalement, la conduite d'expériences *in vivo* sur des rats a fourni les preuves nécessaires pour démontrer la capacité de la TOL envers cette application particulière. L'établissement de cartes d'activation tridimensionnelles a mis en évidence l'activité neuronale présente dans la totalité de la moelle épinière en permettant de distinguer avec une précision satisfaisante les contributions du signal sur différentes profondeurs d'observation.

## ABSTRACT

Several functional imaging methods, such as functional Magnetic Resonance Imaging, Diffuse Optical Imaging or Intrinsic Optical Imaging, have been developed in order to quantify neuronal activity. Although they were extensively applied to the cortex, their application to the spinal cord is rare. The physiological and anatomical issues including respiratory movement, small size, presence of magnetic susceptibility artefacts and inversion between grey matter and white matter compared to the brain make standard imaging techniques feeble. Laminar Optical Tomography (LOT) is a technique developed recently which fills the gap left between intrinsic optical imaging and diffuse optical imaging. Its principle is based on a scanning light source and detectors across the surface of the imaged tissue. Using distinct source-detector separations, the light at different depths in tissue can be distinguished thus providing depth sensitivity.

This M.Sc work proposed to develop a Laminar Optical Tomography system in order to apply it to the imaging of neural activity in the rat spinal cord. After the design stage, acquisitions with various phantoms are made to characterize the system performances and validate its stability and robustness.

Finally, *in vivo* experiments were conducted on rats, providing evidence that LOT can be applied for this particular application. The reconstruction of three-dimensional activation maps highlighted for the first time the neural activity in the whole spinal cord with optical technique making it possible to distinguish the signal contributions from various depths of observation.

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE .....	III
REMERCIEMENTS .....	IV
RÉSUMÉ .....	VI
ABSTRACT .....	VII
TABLE DES MATIÈRES .....	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XVI
LISTE DES ANNEXES.....	XIX
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE .....	7
1.1    Imagerie de l'activation neuronale : l'état de l'art, les différentes techniques et leur position dans la chaîne hémodynamique .....	7
1.1.1    La réponse hémodynamique .....	7
1.1.2    Les mesures électrophysiologiques.....	10
1.1.3    Les mesures hémodynamiques.....	11

1.2	Imagerie de l'activation neuronale dans la moelle épinière .....	12
1.2.1	Anatomie de la moelle et organisation du système nerveux central .....	12
1.2.2	Mesures électrophysiologiques .....	16
1.2.3	Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf) .....	17
1.2.4	Imagerie Optique Intrinsèque (IOI) .....	18
1.2.5	Tomographie Optique Laminaire (TOL) .....	20
<b>CHAPITRE 2 L'INSTRUMENT DE TOMOGRAPHIE OPTIQUE LAMINAIRE .....</b>		<b>23</b>
2.1	L'instrument optique .....	24
2.1.1	Le trajet de la lumière .....	24
2.1.2	Formation d'image et grandissement .....	28
2.2	L'instrument virtuel .....	32
2.2.1	L'acquisition des données de photodiodes .....	33
2.2.2	Le traitement et la sauvegarde des données .....	34
2.2.3	Le contrôle de l'illumination .....	36
2.3	L'interface électronique .....	37
2.3.1	L'amplification transimpédance .....	39
2.3.2	Le filtrage passe-bas des données .....	40
2.3.3	L'amplification opérationnelle des données filtrées .....	41
2.3.4	Alimentation de la diode laser et Conversion des sorties de miroirs en signaux d'horloge .....	43
<b>CHAPITRE 3 THÉORIE DE PROPAGATION DE LA LUMIÈRE .....</b>		<b>46</b>
3.1	La propagation de la lumière .....	46
3.1.1	Principes généraux .....	46
3.1.2	Principaux chromophores .....	47
3.1.3	Diffusion lumineuse .....	48
3.2	Modélisation mathématique et problème direct .....	52
3.2.1	Équation de transfert radiatif .....	52

3.2.2	Modèle Monte-Carlo pour le transport des photons dans les tissus biologiques .....	58
3.3	Définition du problème inverse.....	62
3.3.1	Description générale du problème .....	62
3.3.2	Approximation de Born et linéarisation du problème lors de faibles changements d'absorption.....	63
3.3.3	Description numérique à travers un problème linéaire et inversion .....	65
3.3.4	Régularisation .....	66
3.3.5	Exemple de reconstructions 3D en simulation.....	68
 CHAPITRE 4 CARACTÉRISATION DES PERFORMANCES DE L'IMAGEUR .....		70
4.1	Propriétés optiques .....	71
4.1.1	Champ de vision maximal.....	71
4.1.2	Résolution .....	73
4.1.3	Grandissement.....	74
4.2	Mesures sur fantômes diffusants .....	75
4.2.1	Description du fantôme utilisé .....	76
4.2.2	Images de fantômes.....	76
4.2.3	Quantification des performances.....	79
 CHAPITRE 5 ARTICLE 1: LAMINAR OPTICAL TOMOGRAPHY OF THE HEMODYNAMIC RESPONSE IN THE LUMBAR SPINAL CORD IN RATS .....		85
5.1	Abstract .....	86
5.2	Introduction .....	86
5.3	Methodology .....	88
5.3.1	Animal preparation.....	88
5.3.2	Acquisition system .....	89
5.3.3	Imaging protocol .....	91
5.4	Results .....	92

5.5	Discussion .....	97
5.6	Conclusion .....	99
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE .....		100
CONCLUSION .....		105
LISTE DE RÉFÉRENCES .....		106
ANNEXES .....		121

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 2.1 :</b> Distances source-détecteur .....	31
<b>Tableau 4.1 :</b> Contraintes liées à l'imagerie de la moelle épinière du rat.....	70

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1 :</b> Illustration schématique de la réponse hémodynamique avec les principales modalités d'imagerie permettant de la mesurer. TEP : Tomographie par Émission de Positron, IOI : Imagerie Optique Intrinsèque, IOD : Imagerie Optique Diffuse, TOL : Imagerie Optique Laminaire, IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle, ASL : Arterial Spin Labeling, BOLD : Blood Oxygenation Level Dependent. ....	9
<b>Figure 1.2 :</b> Modèle de la réponse hémodynamique. ....	12
<b>Figure 1.3 :</b> a) Structure anatomique du cortex, b) Structure anatomique de la moelle épinière. Tirées de Widmaier et al. 2004. ....	13
<b>Figure 1.4 :</b> Coupe histologique de la moelle épinière. Tirée de mediatheque.parisdescartes.fr. ....	14
<b>Figure 1.5 :</b> a) Mécanisme réflexe poly-synaptique, b) Positions des voies cortico-spinales. ....	15
<b>Figure 1.6 :</b> Illustration schématique de l'instrument d'IOI. ....	19
<b>Figure 1.7 :</b> Illustration schématique de l'instrument de TOL. ....	21
<b>Figure 2.1 :</b> Illustration schématique de l'instrument d'imagerie. ....	23
<b>Figure 2.2 :</b> a) Trajet de la lumière, b) Photographies de l'imageur optique avec et sans la plaquette de détecteurs. ....	25
<b>Figure 2.3 :</b> Photographie des miroirs pivotants avec leurs réponses temporelles. ....	26
<b>Figure 2.4 :</b> Patron d'une image créée par l'imageur TOL. ....	27
<b>Figure 2.5 :</b> Matrice de photodiodes à avalanche. ....	28
<b>Figure 2.6 :</b> Illustration des rayons lumineux pour un agrandissement optique de 1. ....	29
<b>Figure 2.7 :</b> Schéma-bloc opérationnel du code d'acquisition. ....	32
<b>Figure 2.8 :</b> Bloc d'acquisition des données de photodiodes. ....	33
<b>Figure 2.9 :</b> Interface graphique d'utilisation de l'instrument virtuel. ....	34
<b>Figure 2.10 :</b> Bloc de traitement des données de photodiodes. ....	35

<b>Figure 2.11 :</b> Schéma-bloc opérationnel de l'interface électronique .....	37
<b>Figure 2.12 :</b> a) Circuit de la matrice de photodiodes avec étage amplification transimpédance, b) Circuit établissant la connexion entre la carte National Instruments et le circuit a) et assurant les autres opérations de l'interface électronique. ....	38
<b>Figure 2.13 :</b> Schéma électrique amplificateur transimpédance .....	39
<b>Figure 2.14 :</b> Schéma électrique amplificateur inverseur avec réglage du décalage. ....	42
<b>Figure 2.15 :</b> Console de contrôle des miroirs .....	44
<b>Figure 2.16 :</b> Schéma électrique du montage comparateur à hystéresis. ....	44
<b>Figure 2.17 :</b> Schéma électrique du montage comparateur redresseur. ....	45
<b>Figure 3.1 :</b> Spectre d'absorption de l'hémoglobine oxygénée (HbO) et désoxygénée (HbR), de l'eau (H <sub>2</sub> O) et des lipides (Lip). Tirées de Takatani et Graham (1987).....	47
<b>Figure 3.2 :</b> Élément cylindrique de volume stationnaire. Ici, $ds$ est l'élément de longueur du cylindre le long de la direction de propagation $\hat{s}$ ; $dA$ est l'élément d'aire du cylindre perpendiculaire à $\hat{s}$ . $d\Omega$ et $d\Omega'$ sont les éléments d'angle solide autour des directions $\hat{s}$ et $\hat{s}'$ respectivement.....	53
<b>Figure 3.3 :</b> Schéma de la technique utilisée par tMCimg .....	61
<b>Figure 3.4 :</b> Profils de sensibilité obtenus pour chaque détecteur.....	62
<b>Figure 3.5 :</b> Reconstructions de données simulées aux profondeurs de 0, 500, 1000, 1500 et 2000 $\mu\text{m}$ , a) Données sans bruit, b) Données avec RSB = 40, c) Données avec RSB = 20.....	68
<b>Figure 3.6 :</b> Reconstructions d'une structure complexe, a) Données sans bruit, b) Données avec RSB = 60, c) Données avec RSB = 40. ....	69
<b>Figure 4.1 :</b> Portion de la grille de calibration. ....	71
<b>Figure 4.2 :</b> Image par TOL caractérisant le champ de vision maximal. ....	72
<b>Figure 4.3 :</b> Cible microscopique de détermination de la résolution. ....	73
<b>Figure 4.4 :</b> a) Mesure expérimentale du grossissement, b) Fantôme solide. ....	75
<b>Figure 4.5 :</b> Tube d'encre à profondeur contrôlée dans une solution d'intralipide.....	76
<b>Figure 4.6 :</b> a) Image non corrigée avec distorsion sinusoïdale. b) Image corrigée par interpolation de la position.....	77

<b>Figure 4.7 :</b> Résultats expérimentaux obtenus sur fantôme à différentes profondeurs. 0 µm. 500 µm. 1000 µm. 1500 µm. 2000 µm. 2500 µm.....	78
<b>Figure 4.8 :</b> Pourcentage de bruit par pixel par détecteur selon la tension d'alimentation. a) 408 V. b) 410 V. c) 413V.....	80
<b>Figure 4.9 :</b> Étalonnage du pourcentage de bruit des détecteurs selon leur gain. ....	81
<b>Figure 4.10 :</b> Ligne du dessus : Images de fantôme. Ligne du dessous : Profil d'intensité lumineuse du fantôme. ....	82
<b>Figure 4.11 :</b> Contraste local par détecteur en fonction de la profondeur.....	82
<b>Figure 4.12 :</b> Signal sur bruit différentiel par détecteur en fonction de la profondeur. ....	83
<b>Figure 5.1 :</b> Experimental setup: LOT system design.....	91
<b>Figure 5.2 :</b> LOT hemodynamic response with left hind paw stimulus intensity at 0.9×, 1.2× and 1.5× muscle threshold in normal rat, vertical lines indicate stimulus onset. Shadowed area indicates mean ± standard deviation, $N = 29$ blocks of 60 seconds. (A) Averaged time course of region 1, which is ipsilateral to stimuli. (B) Top: Imaged area of the exposed spinal cord, the bright spot located at the lower part is due to specular reflection artefacts. Bottom: Time course (red dotted line) of region 2, corresponding to the superficial blood vessel shows ~1 s delayed activation with regard to ipsilateral activation. (C) Time course of region 3, contralateral to stimuli. In this region smaller amplitude and greater deviations are observed when compared to ipsilateral response.	94
<b>Figure 5.3 :</b> (A) Time course of LOT signals induced by left hind paw stimulation collected over 15s at 0.9× muscle threshold. (B) Maximum intrinsic optical signal acquired on somatosensory cortex simultaneously.....	95
<b>Figure 5.4 :</b> Three-dimensional map of neural activation in the spinal cord induced by left hind paw stimulation at 0.9× muscle threshold. We observe ipsilateral activation around $z = 0.8 - 1\text{mm}$ consistent with neuronal activation of interneurons.....	96

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

### ABRÉVIATIONS

ASL	Arterial spin labelling
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BOLD	Blood-oxygen-level dependent, pour dépendant du niveau d'oxygénéation sanguine
ECG	Électrocardiogramme
EEG	Électro-encéphalographie
HbO	Hémoglobine oxygénée
HbR	Hémoglobine désoxygénée
IO	Imagerie optique
IOD	Imagerie optique diffuse
IOI	Imagerie optique intrinsèque
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
MEG	Magnétoencéphalographie
NIRS	Near infra red spectroscopy, pour spectroscopie proche infra rouge
RSB	Rapport signal sur bruit
TACO	Tomographie axiale calculée par ordinateur
TEP	Tomographie par émission de positrons
TOL	Tomographie optique laminaire
TTL	Transistor - Transistor Logic

## SIGLES

$A$	Selon le contexte, l'aire d'une surface, l'absorption ou la matrice de sensibilité
$C$	Selon le contexte, la capacité d'un condensateur, le contraste ou la concentration d'un chromophore
$f$	Distance focale d'une lentille
$F$	Fréquence
$F_c$	Fréquence de coupure d'un filtre
$F_e$	Fréquence d'échantillonnage
$g$	Anisotropie de dispersion
$G$	Selon le contexte, le gain électronique ou une fonction de Green
$I$	Selon le contexte, l'intensité du courant électrique ou l'intensité lumineuse
$L$	Selon le contexte, le trajet optique ou l'opérateur de dispersion
$OD$	Densité optique
$N$	Densité de photons
$P$	Puissance
$R$	Selon le contexte, la valeur de résistance ou la réflectance
$\hat{s}$	Direction de propagation des photons
$V$	Selon le contexte, la tension électrique ou le volume
$\alpha$	Selon le contexte, la polarisabilité d'un photon ou le paramètre de lissage de la régularisation de Tikhonov
$\delta$	Impulsion de Dirac
$\Delta$	Variation
$\varepsilon$	Coefficient d'extinction d'un chromophore
$\varphi$	Radiance
$\Phi$	Fluence
$\gamma$	Grandissement optique
$\mu_a$	Coefficient d'absorption

$\mu_s$	Coefficient de dispersion
$\Omega$	Angle solide
$\sigma_s$	Section d'un photon
$\theta$	Selon le contexte, l'angle de rotation des miroirs ou l'angle de la direction de propagation des photons
$\Theta$	Fonction de phase normalisée

## **LISTE DES ANNEXES**

<b>ANNEXE 1 – Bases d'optique géométrique .....</b>	<b>121</b>
<b>ANNEXE 2 – Description de la théorie probabiliste de la méthode Monte-Carlo.....</b>	<b>124</b>

## INTRODUCTION

En Amérique du Nord, on répertorie chaque année 12000 nouveaux cas de traumatismes de la moelle épinière. Au Canada, le nombre de victimes souffrant d'une lésion médullaire s'élève actuellement à plus de 36000. Les répercussions thérapeutiques sur les patients atteints varient suivant le type et la localisation dorsale du traumatisme subi. Il peut engendrer des troubles des fonctions motrices et sensitives. Ces lésions peuvent se traduire par une perte complète de la locomotion comme chez les patients dont la moelle épinière est entièrement sectionnée, paraplégiques (paralysie des membres inférieurs) ou tétraplégiques (paralysie totale), ou encore des douleurs chroniques comme chez les patients atteints d'une lésion périphérique (moelle non sectionnée mais endommagée). Aux conséquences psychologiques et physiques dévastatrices qui obligent ces personnes à complètement réviser leur mode de vie, s'ajoutent les coûts liés aux soins à domicile pouvant atteindre de 1.25 million jusqu'à 25 millions de dollars par patient au cours de leur existence.

Le fait le plus déroutant lié à ces traumatismes est que nous avons aujourd'hui encore des difficultés à comprendre les physiopathologies qui leur sont liées. Notre connaissance des conséquences physiologiques et fonctionnelles des lésions de la moelle épinière et surtout sur les processus d'activation neuronale existant au sein de celle-ci reste encore très limitée malgré qu'elle soit en perpétuelle évolution. La moelle épinière a déjà suscité de nombreuses études cliniques sur les traitements pharmaceutiques et chirurgicaux à administrer à un patient victime d'une lésion médullaire, (Hall et Wolf 1986, Bracken et al. (1990, 1997), George et al. 1995, Waters et al. 1999). La littérature contient beaucoup de publications sur l'activation neuronale du cortex alors que celles sur la moelle sont plus rares, néanmoins plusieurs travaux ont déjà abordé son imagerie fonctionnelle. Cependant les méthodes existantes pour traiter cette problématique sont encore embryonnaires. L'organisation spatiale et les réseaux neuronaux de la moelle restent mal compris.

Une compréhension accrue des circuits neuronaux dans la moelle épinière pourrait ouvrir à la communauté médicale de nouvelles voies d'exploration pour le traitement et

l'amélioration du quotidien des patients atteints de traumatismes médullaires. Une meilleure connaissance nécessite d'effectuer des mesures à grande échelle, permettant de relier les différents réseaux de l'activité neuronale présente au sein de celle-ci en employant des méthodes qui peuvent fournir des résultats qui soient pertinents et reproductibles.

Dans ce cadre, les techniques d'imagerie semblent tout à fait appropriées. En 1895, Wilhelm Conrad Röntgen découvrait les rayons X. Depuis, l'imagerie médicale est devenue essentielle afin d'appréhender le corps humain. Les deux dernières décennies ont vu des avancées technologiques majeures permettant l'apparition de nouvelles modalités d'imagerie qui sont maintenant devenues des techniques standards d'examen en milieu hospitalier pour plusieurs diagnostics.

Parmi les techniques disponibles, se distinguent deux branches selon la nature de l'information qui est délivrée. La première regroupe les modalités d'imagerie dites anatomiques ou structurelles. Comme leur nom l'indique, ces techniques fournissent des images montrant les détails structurels des tissus observés. Les techniques les plus courantes sont les suivantes :

- la radiographie conventionnelle basée sur la physique des rayons X permet d'établir des clichés en deux dimensions des organes internes. Elle est surtout utilisée pour l'observation des tissus durs (os, tumeurs) car c'est eux qui ont le meilleur contraste d'observation avec les rayons X de par leur densité (détection de fractures ...),
- la tomodensitométrie ou tomographie axiale calculée par ordinateur (TACO) plus connue sous sa terminologie anglaise CT-Scan. Comme la radiographie, elle utilise des rayons X mais elle permet d'obtenir des informations tridimensionnelles sur un volume complet. Elle est utilisée pour l'observation des tissus durs mais aussi celle des tissus mous en injectant des agents de contraste particuliers,

- l'échographie, qui est basée sur l'utilisation d'ultrasons, permet d'obtenir des coupes de l'organe étudié et des images tridimensionnelles depuis peu. Elle est très utilisée en obstétrique pour examiner le fœtus dans le ventre de sa mère ainsi que pour certains types de cancers. Contrairement aux techniques précédentes, elle n'est pas irradiante donc beaucoup moins nocive,
- l'imagerie par résonance magnétique (IRM) basée sur l'utilisation de champ magnétique permet d'observer en trois dimensions les tissus mous avec un meilleur contraste que la TACO de manière non-invasive et non-nocive. Néanmoins, l'IRM ne permet pas l'étude des tissus durs et ne permet donc pas de détecter les fractures.

La seconde branche est qualifiée de fonctionnelle car ces différentes modalités fournissent des informations sur la fonction des divers organes de manière directe ou indirecte. Voici les techniques les plus courantes :

- l'électrophysiologie permet de mesurer les signaux électriques délivrés par les tissus biologiques (neurones, fibres musculaires) à l'aide d'électrodes de surface ou implantées mais sans donner de renseignement sur la structure des tissus imagés. Elle est très utilisée chez l'être humain avec l'electrocardiogramme (ECG), l'électroencéphalographie (EEG) et la magnétoencéphalographie (MEG),
- la médecine nucléaire avec la tomographie par émission de positrons (TEP ou PET en anglais) qui permet de mesurer en trois dimensions l'activité métabolique d'un organe en injectant un traceur radioactif dont le comportement est connu. Cette technique est néanmoins limitée en résolution spatiale et temporelle,
- l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) qui permet d'obtenir des informations sur les fonctionnalités du cerveau de manière indirecte en

imageant les variations de la déoxyhémoglobine (sang désoxygéné) dans les tissus cérébraux,

- l'imagerie optique (IO), qui utilise les ondes lumineuses, fournit des informations analogues à l'IRMf en imageant les variations d'intensité lumineuse.

On évalue une technique d'imagerie fonctionnelle au moyen de plusieurs critères :

- la résolution spatiale : avec quelle précision spatiale détecte-t-on les signaux émis par rapport au niveau de référence ?
- la résolution temporelle : à quelle vitesse les signaux sont-ils acquis selon les processus biologiques observés ?
- le caractère invasif : la technique est-elle nocive pour le sujet ?
- la sensibilité : avec quelle précision détecte-t-on les variations de signaux ?

La moelle épinière présente plusieurs caractéristiques qui sont déterminantes dans le choix de la modalité d'imagerie à utiliser. Tout d'abord, son diamètre est relativement faible, 7 à 8 mm chez l'être humain. La problématique étant l'imagerie de l'activation neuronale, la technique à choisir doit donc avoir une résolution spatiale suffisante pour localiser les foyers d'activation ainsi qu'une résolution temporelle et une sensibilité permettant de détecter les changements de nature fonctionnelle. L'électrophysiologie possède une excellente résolution temporelle mais ne donne pas d'informations spatiales et peut se révéler parfois très invasive. La TEP est peu sensible, peu précise spatialement comme temporellement et elle est assez nocive. L'IRMf se révèle être excellente sur le plan invasif mais possède une très mauvaise résolution temporelle. De plus, la proximité de la moelle avec les poumons entraîne du mouvement dû à la respiration. Cette dernière caractéristique

constitue un obstacle pour l'IRMf qui ne tolère pas le mouvement. Enfin l'imagerie optique possède une résolution temporelle excellente mais sa résolution spatiale et sa sensibilité peuvent varier suivant le type d'IO utilisée. Généralement, bonne résolution spatiale et sensibilité élevée sont synonymes en IO de caractère invasif. Par conséquent, l'IO n'est pas adaptée à l'imagerie de la moelle épinière humaine. Voilà pourquoi l'imagerie de la moelle épinière du petit animal présente de l'intérêt. Le modèle du rat étant actuellement un des plus appropriés à la compréhension des réseaux neuronaux, l'étude de moelles épinières de rats pourrait fournir des renseignements sur la localisation de l'activité neuronale à l'aide d'une technique d'IO adaptée. Les éléments à considérer sont le faible diamètre, 2 mm chez le rat, les variations de signal optique qui sont de l'ordre de 1% et enfin l'inversion matière grise - matière blanche comparée au cerveau. Ces contraintes impliquent donc l'utilisation d'une technique suffisamment sensible et résolue pour détecter ces variations en profondeur sur la totalité de la moelle afin d'obtenir une localisation précise des foyers d'activation neuronale.

La problématique à l'origine de ce projet est l'application d'une technique d'imagerie optique qui puisse constituer une solution adéquate à l'imagerie de la moelle épinière du rat considérant les critères décrits précédemment. Une nouvelle modalité d'imagerie appelée Tomographie Optique Laminaire (TOL) semble répondre à cette problématique car elle permet de recueillir des informations fonctionnelles relativement résolues pour des profondeurs équivalentes au diamètre de la moelle. Ainsi ce travail de maîtrise propose de démontrer la faisabilité de l'application de cette modalité par TOL à l'imagerie fonctionnelle en trois dimensions de la totalité de la moelle épinière chez le rat à la suite d'une stimulation d'un des membres inférieurs.

Le mandat de ce travail de maîtrise consistait à atteindre les objectifs suivants :

- O1. Développer un système d'imagerie par TOL adapté à la moelle épinière du rat.**
- O2. Caractériser ses performances et valider sa robustesse en effectuant des acquisitions sur fantômes.**
- O3. Effectuer des expériences *in vivo* sur la moelle épinière du rat.**
- O4. Valider les résultats obtenus dans la moelle en corrélant la réponse hémodynamique de la moelle avec celle du cerveau à l'aide de l'imagerie optique intrinsèque.**
- O5. Établir et analyser des cartes tridimensionnelles de l'activation neuronale de la totalité de la moelle épinière du rat.**

Les hypothèses de travail étaient les suivantes :

- H1. La réponse hémodynamique de la moelle épinière est mesurable par TOL.**
- H2. La TOL permet d'observer et de distinguer la réponse de l'organisation vasculaire de surface et de profondeur.**

# CHAPITRE 1

## REVUE DE LITTÉRATURE

### 1.1 Imagerie de l'activation neuronale : l'état de l'art, les différentes techniques et leur position dans la chaîne hémodynamique

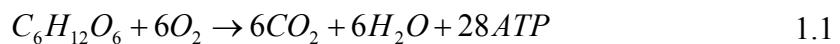
#### 1.1.1 La réponse hémodynamique

Le lien entre l'activité neuronale et les changements hémodynamiques fut d'abord énoncé par Roy et Sherrington 1890. Ils s'aperçurent qu'une stimulation électrique d'un nerf sensitif chez le chien entraîne systématiquement une expansion du cortex, une dilatation des vaisseaux sanguins ainsi qu'une croissance de la pression artérielle. La stimulation engendre immédiatement cette réaction en chaîne qui persiste durant quelques secondes. Depuis la fin des années 90, beaucoup de travaux ont confirmé que l'activation neuronale entraîne une augmentation locale du flux sanguin ainsi que des variations du volume et de la concentration sanguine en oxygène. Ces changements sont aussi bien observés dans le cortex que dans la moelle épinière. Cette chaîne d'évènement qui met en évidence le couplage neurovasculaire se nomme la réponse hémodynamique.

Lorsqu'un neurone s'active à la suite d'un stimulus (visuel, moteur, auditif...), l'influx nerveux se transmet sous la forme de potentiels d'action qui se produisent à haute fréquence. Pour équilibrer le milieu suite à ce phénomène, les concentrations en ions présents dans le neurone, en particulier le sodium  $\text{Na}^{2+}$ , le potassium  $\text{K}^+$  et le calcium  $\text{Ca}^{2+}$ , doivent être rétablies rapidement. En effet, une unique décharge de potentiel d'action perturbe l'état de repos qui doit être recouvert avant qu'un autre potentiel d'action puisse être émis. Le rétablissement de ces concentrations ioniques est assuré par des pompes

ioniques actives situées au travers des parois de la membrane des cellules neuronales. Ces pompes actives se chargent de transférer les ions à travers la membrane.

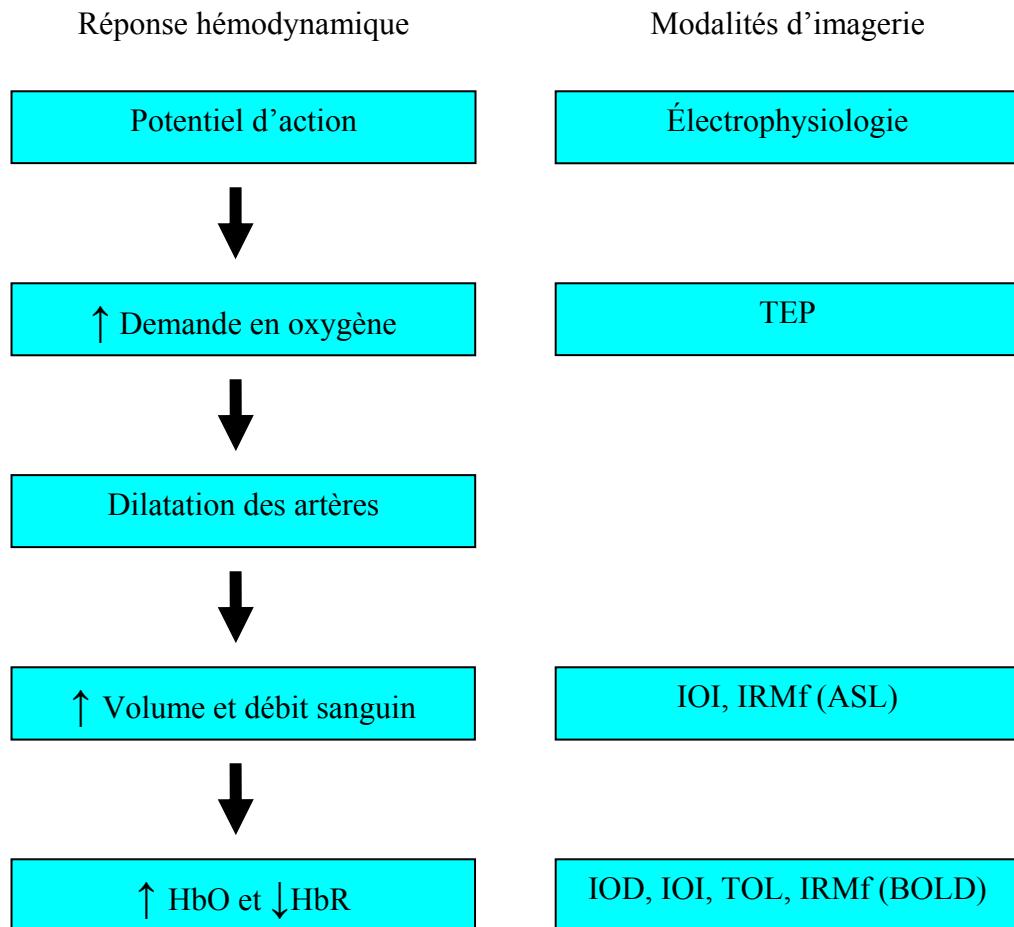
Comme tout mécanisme, ces pompes ont besoin d'énergie pour fonctionner. Cette demande énergétique est fournie par l'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP peut être créé soit par un processus de respiration aérobie (1.1), soit par assimilation du glucose, la glycolyse (1.2), (Widmaier et al. 2004). Les deux processus sont décrits par les réactions suivantes :



On remarque que seul le processus de respiration aérobie consomme de l'oxygène, néanmoins ce dernier est beaucoup plus efficace que celui de la glycolyse dans la mesure où il produit 14 fois plus d'ATP pour la même quantité de glucose. De surcroît, la respiration aérobie produit aussi du dioxyde de carbone qui devra être éliminé par le système sanguin veineux. Dès lors que le neurone accroît son activité, les pompes ioniques s'activent. Leurs besoins énergétiques sont satisfaits par les réserves d'ATP cependant lorsque ces réserves deviennent insuffisantes, le neurone augmente alors sa consommation en oxygène (Magistretti et Pellerin 1997, Shulman et al. 2002, Raichle 2001, Raichle 2006, Raichle et Mintun 2006) dans le but de produire de l'ATP par le biais de la respiration aérobie. Par conséquent, plus le neurone sera activé, plus la demande en oxygène sera conséquente.

Pour satisfaire cette demande supplémentaire en oxygène, des mécanismes de rétroaction entrent en jeu afin de dilater les artères qui transportent le sang oxygéné vers les neurones (Toda et Okamura 1993) ayant pour conséquence d'augmenter localement le volume ainsi que le débit sanguin (Buxton et Frank 1997, Buxton et al. 1998, Buxton et al. 2004). Comme le sang provenant des artères est à haute teneur en hémoglobine oxygénée (HbO), il y aura augmentation de la concentration locale de HbO. En pratique, cette augmentation

du débit suralimente le besoin en oxygène, ainsi il y a un apport trop grand de HbO et l'hémoglobine désoxygénée (HbR) créée par le métabolisme local se verra diluée dans l'hémoglobine oxygénée entrante. Par conséquent, la concentration locale en HbR diminuera. À l'inverse, la concentration en HbO va augmenter (Dunn et al. 2005) puisque le flux croît. La figure 1.1 donne un aperçu de la réaction en chaîne de la réponse hémodynamique juxtaposée aux techniques d'imagerie permettant d'effectuer des mesures des phénomènes illustrés.



**Figure 1.1 :** Illustration schématique de la réponse hémodynamique avec les principales modalités d'imagerie permettant de la mesurer. TEP : Tomographie par Émission de Positron, IOI : Imagerie Optique Intrinsèque, IOD : Imagerie Optique Diffuse, TOL : Imagerie Optique Laminaire, IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle, ASL : Arterial Spin Labeling, BOLD : Blood Oxygenation Level Dependent.

Plus la modalité d'imagerie se situe haut dans la chaîne, plus elle fournit une information directe sur l'activité neuronale. Dans la mesure où la Tomographie Optique Laminaire (TOL) est basée sur les variations d'oxygénation de l'hémoglobine dans les tissus imaginés, elle fait partie des modalités d'imagerie indirecte.

### 1.1.2 Les mesures électrophysiologiques

L'électrophysiologie est la technique d'imagerie fonctionnelle la plus directe qui existe. Elle repose sur la mesure des signaux électriques émis lors d'une activation neuronale (les potentiels d'action). Ses domaines d'application sont larges et les différentes techniques disponibles sont fréquemment utilisées dans les hôpitaux : l'électroencéphalographie (EEG) et la magnétoencéphalographie (MEG) mesurent respectivement l'activité électrique et magnétique de populations de neurones dans le cerveau. De même, l'électrocardiogramme permet de contrôler l'activité cardiaque. L'utilisation d'électrodes implantées permet de préciser la localisation de l'activité neuronale au prix d'une mesure invasive.

À part la magnétoencéphalographie, ces techniques sont fondées sur l'utilisation d'électrodes à la surface des tissus ou même au sein des tissus. L'électrophysiologie fournit donc une mesure directe de l'activité des neurones et ce avec une excellente résolution temporelle. Néanmoins, ces techniques rendent plus difficile l'obtention d'informations spatiales. En EEG et MEG il est possible de développer une méthodologie d'imagerie en utilisant un problème inverse mais la résolution reste faible (de l'ordre du centimètre) et ces techniques sont difficilement applicables à la moelle. Dans les cas où il est nécessaire d'implanter les électrodes dans les tissus, l'obtention d'information spatiale nécessite un grand nombre d'électrodes et ces implantations entraînent des risques de perturbation et de modification de l'activité neuronale dus à l'endommagement des tissus imaginés.

### 1.1.3 Les mesures hémodynamiques

Au début des années 1990, plusieurs études se sont appliquées à démontrer la capacité d'utilisation de l'IRM fonctionnelle (IRMf) pour imager l'activation neuronale du cortex, (Belliveau et al. 1990, Ogawa et al. (1990a, 1990b, 1992), Bandettini et al. 1992, Kwong et al. 1992). Depuis, l'IRMf-BOLD est devenue une technique d'imagerie fonctionnelle très utilisée pour analyser les fonctionnalités du cortex humain. En effet, son caractère non-invasif rend son utilisation attrayante. L'observation du contraste BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent) repose sur la nature paramagnétique de la déoxyhémoglobine HbR. Pour des approfondissements théoriques, il est conseillé au lecteur de consulter Prince et Links 2006 ainsi que plusieurs revues telles Arthurs et Boniface 2002, Attwell et Iadecola 2002, Buxton 2002, Logothetis 2002, Uğurbil et al. 2003.

Comme l'IRMf, les techniques d'imagerie optique reposent sur les mesures hémodynamiques. Les revues de la fin des années 90 comme Hebden et al. 1997, Arridge et Hebden 1997 résument l'état de l'art de l'imagerie optique de l'époque. La première revue (Hebden et al. 1997) présente les aspects relatifs à l'instrumentation et à l'expérimentation alors que la seconde (Arridge et Hebden 1997) décrit la modélisation de la propagation de la lumière dans les tissus ainsi que les méthodes de reconstruction d'images. On retrouve aussi la physique du transport de la lumière dans plusieurs travaux tels que Arridge 1999, Boas et al. 2001, Schweiger et al. 2003.

Depuis l'imagerie optique est largement utilisée pour la recherche en imagerie fonctionnelle. Le principe de l'IO est fondé sur l'observation des changements d'absorption de l'hémoglobine lors d'une réponse hémodynamique qui fait suite à l'activation neuronale. La concentration en HbO augmente alors que la concentration en HbR diminue, Fig. 1.2. Par conséquent, l'absorption de HbO augmente et celle de HbR diminue ce qui engendre

des changements dans l'intensité de la lumière s'étant propagée dans les tissus. Ces variations d'intensité lumineuse, de volume et de débit sanguin sont mesurables par IO.

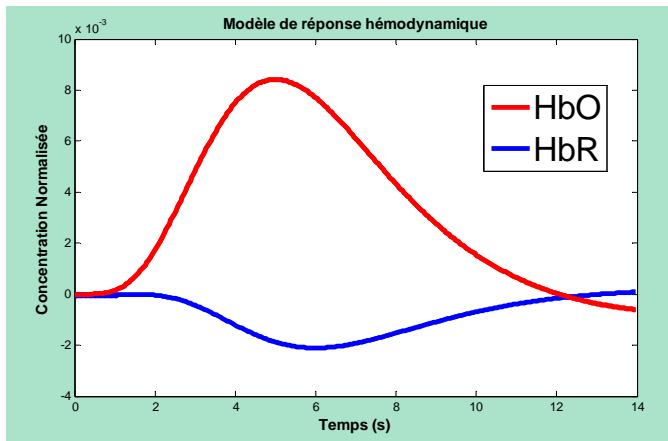


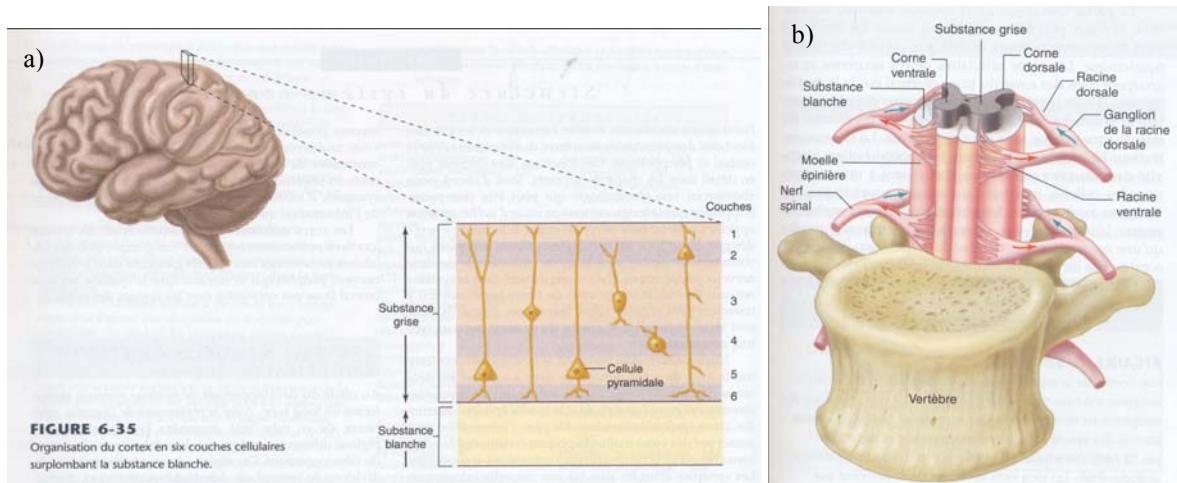
Figure 1.2 : Modèle de la réponse hémodynamique.

## 1.2 Imagerie de l'activation neuronale dans la moelle épinière

### 1.2.1 Anatomie de la moelle et organisation du système nerveux central

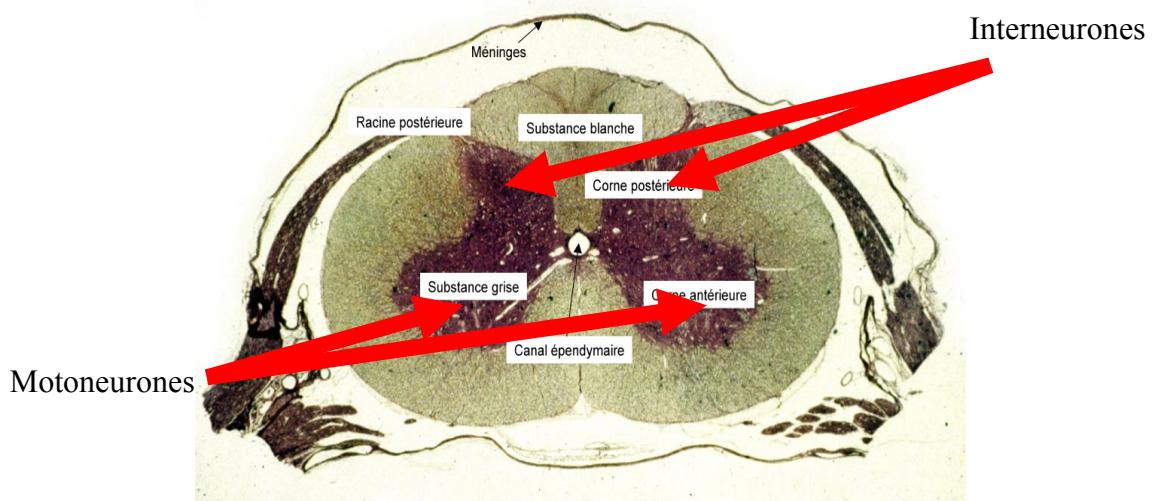
Le système nerveux central est composé du cortex et de la moelle épinière. La matière grise du cortex est constituée de différents neurones et de cellules gliales qui se situent en périphérie. La matière blanche est composée des axones et des dendrites des fibres sensitives et motrices. Elle est située à l'intérieur du cortex, son but est de transmettre les impulsions nerveuses vers les neurones de la matière grise qui sont chargés de traiter ces messages nerveux. Dans le cas de la moelle épinière, cette organisation est différente. En effet, la matière grise de la moelle épinière est constituée des interneurones, des cellules gliales, des corps cellulaires et des dendrites des motoneurones qui sont les neurones uniquement présents dans la moelle et surtout responsables de tout acte moteur ainsi que des neurones sensitifs. De surcroît, la matière grise forme un papillon au centre de la moelle

qui est encerclé par la matière blanche. Ainsi l'organisation matière grise - matière blanche est inversée par rapport au cortex (Fig. 1.3).



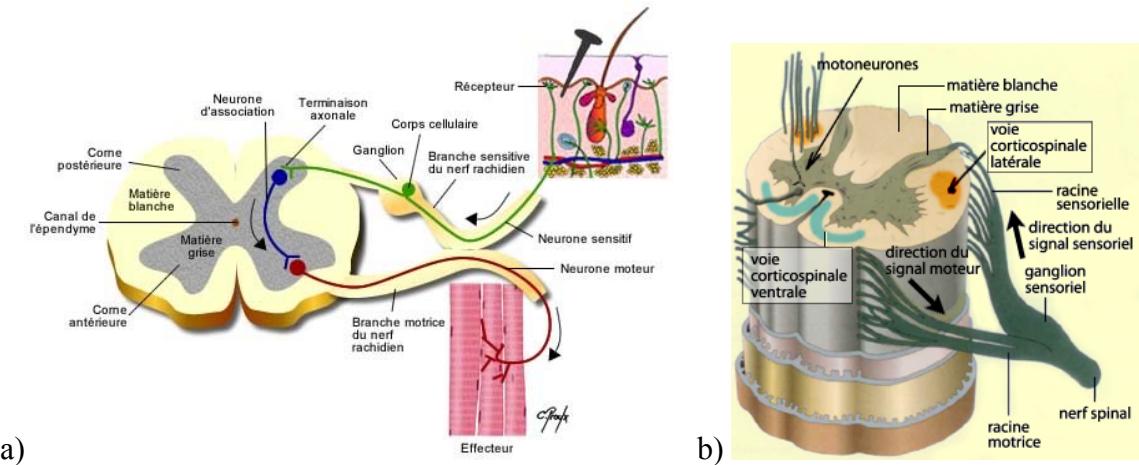
**Figure 1.3 :** a) Structure anatomique du cortex, b) Structure anatomique de la moelle épinière. Tirées de Widmaier et al. 2004.

Nix et al. 1976 a évalué l'épaisseur de matière blanche de la moelle épinière du rat à 200-300 µm, et celle de la matière grise à 1700-2000 µm, (Fig. 1.4). Sur le plan anatomique, la moelle est séparée longitudinalement en 31 segments répartis en quatre groupes différents, en partant du cerveau : les segments cervicaux (C), les segments thoraciques (T), les segments lombaires (L) et enfin les segments sacrés (S). À chacun de ces segments est associée une paire de nerfs spinaux disposés de part et d'autre du segment (Fig. 1.3.b). Ces derniers se divisent en deux racines différentes qui se relient à la moelle : la racine motrice reliée à la partie ventrale de la moelle et qui constitue le faisceau nerveux moteur et la racine sensorielle reliée à la partie dorsale de la moelle.



**Figure 1.4 :** Coupe histologique de la moelle épinière. Tirée de mediatheque.parisdescartes.fr.

Le nerf sciatique est le nerf le plus volumineux du corps. Il a pour origine les branches du tronc lombo-sacré ainsi que les racines S1, S2 et S3. Il est donc relié à plusieurs des nerfs spinaux décrits plus haut. Sa stimulation engendre un mécanisme de réflexe. Il en existe plusieurs au sein de la moelle épinière. Parmi ceux-ci, on distingue un premier mécanisme dit monosynaptique. L'influx nerveux est transmis vers la moelle le long du neurone sensitif pour atteindre son corps cellulaire qui se trouve dans le ganglion spinal. La transmission progresse jusqu'à la terminaison axonale du neurone sensitif qui se situe dans la matière grise de la moelle. L'influx nerveux se propage alors dans le neurone moteur pour atteindre son corps cellulaire au sein des cornes antérieures de la matière grise. Un deuxième mécanisme dit poly-synaptique (Fig. 1.5.a) fait propager l'influx nerveux dans un interneurone qui établit la connexion entre neurone sensitif et neurone moteur. Cet interneurone possède la capacité d'inhiber ou d'exciter l'un ou l'autre neurone. Enfin un troisième mécanisme réflexe, faisant suite à une stimulation, active les voies cortico-spinales. Les voies ascendantes en position dite dorsale ou latérale (Fig. 1.5.b) acheminent l'influx nerveux jusqu'à la région somatosensitive du cerveau alors que les voies descendantes ventrales transmettent les signaux nerveux du cortex moteur vers les muscles.



**Figure 1.5 : a)** Mécanisme réflexe poly-synaptique, **b)** Positions des voies cortico-spinales.

La réponse hémodynamique à une activation neuronale fait suite à une transmission inter-synaptique de l'influx nerveux. Justement, la moelle épinière contient trois catégories différentes de synapses : entre un neurone sensitif et un interneurone, entre un motoneurone et un interneurone et enfin entre un neurone sensitif et un motoneurone. Ces catégories de synapses n'étant pas toutes localisées à la même profondeur, l'IO permettra donc de dire quel type de neurone s'active suivant la profondeur d'activation observée.

En effet, les motoneurones sont situés dans la corne ventrale antérieure en dessous du canal de l'épendyme alors que les interneurones sont concentrés dans la corne dorsale.

Willis et Coggeshall 1991 ont estimé la proportion entre les populations de motoneurones et d'interneurones dans le segment sacral S2. Ils concluent que les interneurones représentent 97% de la population dans cette région contre 2% pour les motoneurones et 1% pour les neurones des voies cortico-spinales ascendantes. Donc seule l'activation des interneurones, qu'ils estiment présents entre 300 µm et 1000 µm dans la partie dorsale de la moelle, semble pouvoir être mesurée grâce à l'imagerie optique. Sasaki et al. 2002 a utilisé l'Imagerie Optique Intrinsèque pour vérifier cette hypothèse. L'expérience consistait à imager la moelle épinière d'un rat ayant subi une laminectomie après une stimulation de différents nerfs périphériques. Un bloqueur synaptique Cd<sup>2+</sup> injecté à la surface dorsale fut utilisé pour valider les résultats mesurés. L'injection de ce bloqueur entraîna la quasi

disparition du signal optique intrinsèque suggérant ainsi que les signaux détectés étaient principalement générés par les mécanismes activés par les fibres nerveuses sensorielles. Ainsi, ces travaux ont pu établir que jusqu'à présent seule l'activation des voies polysynaptiques est observable par l'imagerie optique. Par conséquent, l'imagerie de l'activité neuronale de la moelle est basée sur l'activation des interneurones qui se situent entre 300 et 1000 µm. Cependant, aucune étude n'a cherché à imager l'activation des motoneurones qui constituent la majorité de la partie ventrale de la moelle. Ainsi, personne ne sait vraiment comment se transmet le signal moteur au sein de la moelle épinière.

### 1.2.2 Mesures électrophysiologiques

Nix et al. 1976 a mesuré le débit sanguin dans la moelle épinière du rat à l'aide d'une électrode à oxygène en la combinant avec une mesure EEG. L'électrophysiologie n'a pas été directement appliquée à la moelle mais ce travail a mis en évidence pour la première fois la relation entre la réactivité vasculaire de la moelle et celle du cortex en montrant qu'elles étaient totalement corrélées.

Valero-Cabré et al. 2004 a mesuré la réorganisation de la réponse réflexe en plusieurs niveaux chez le rat ayant subi une transsection complète de la moelle épinière.

Beaumont et al. (2004, 2008) ont montré que de la rééducation engendre des améliorations des propriétés électrophysiologiques des neurones dans la région lombaire et de la motricité chez le rat atteint d'une lésion médullaire.

Malgré tout, ces études présentent à chaque fois la même faiblesse : elles n'ont jamais pu établir de carte spatiale de l'activation neuronale.

### 1.2.3 Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf)

L'utilisation de l'IRMf pour imager l'activité fonctionnelle au sein de la moelle épinière de l'être humain comme du rat a fait l'objet de plusieurs études, (Yoshizawa et al. 1996, Madi et al. 2001, Stroman et al. (2002, 2004), Malisza et al. 2003, Lilja et al. 2006, Majcher et al. 2007, Maier et al. 2007, Giulietti et al. 2008, Govers et al. 2007).

Lawrence et al. (2004, 2007) ainsi que Zhao et al. 2008 ont imagé la région lombaire de la moelle épinière du rat suivant une stimulation du nerf sciatique. Ces derniers travaux ont permis de confirmer la présence de réponse IRMf-BOLD lors d'activation neuronale.

Weber et al. 2006 ainsi que Mihai et al. 2008 ont tenté d'imager les neuropathologies liées à une lésion médullaire chez le rat avec un appareil IRM à 17.6 Teslas. Ces travaux ont mis en évidence des changements structurels de la moelle avec une réorganisation matière blanche - matière grise importante dans la région du traumatisme. Le processus de cicatrisation a engendré une forte diminution des deux composantes avec une perte de la densité de motoneurones et d'interneurones.

Endo et al. 2008 a réalisé une étude sur la réorganisation des processus sensoriels dans la partie inférieure de la moelle épinière du rat suite à une lésion médullaire. Ce travail suggère une sensibilité nettement accrue des neurones à la stimulation électrique des nerfs périphériques dans la région inférieure de la moelle suite aux lésions.

Plus récemment, Cohen-Adad et al. 2009 a mené une étude de l'activation neuronale au sein de la moelle épinière de chats sous kétamine. Cependant la réponse BOLD obtenue a été très peu reproductible d'un chat à l'autre.

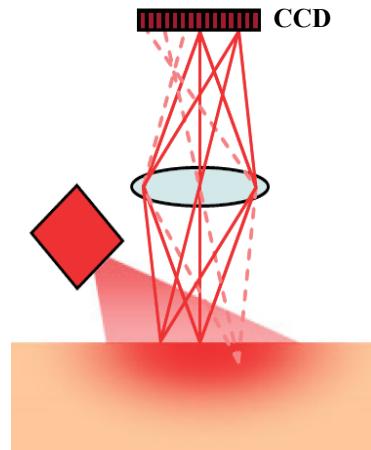
Dans cette application, l'IRMf est une technique très avantageuse car elle est non-invasive. Par contre, elle présente des limitations importantes pour l'imagerie de la moelle épinière du petit animal ainsi que de l'humain. Toutes ces études menées font face aux mêmes difficultés : la faible sensibilité, le mouvement dû à la respiration et la présence d'artéfacts de susceptibilité autour des vertèbres. Les volumes imagés étant très petits dans le cas du

rat, les voxels sont-eux aussi très petits ce qui tend à fournir un rapport signal sur bruit relativement faible. L'augmentation de la sensibilité implique l'accroissement de l'intensité du champ magnétique utilisé pour générer les images. Hors plus l'intensité du champ magnétique est élevée, plus les artefacts de susceptibilité magnétique dus à la présence des vertèbres qui protègent la moelle perturbent la qualité de l'image. Il faut aussi prendre en considération les artefacts de mouvements dus à la respiration qui, à grande résolution spatiale, perturbent la mesure au sein de la moelle épinière par la proximité des poumons.

#### 1.2.4 Imagerie Optique Intrinsèque (IOI)

L'IOI, comme son nom l'indique, est une modalité d'imagerie fonctionnelle qui utilise la lumière. Elle est donc basée sur les propriétés optiques de l'hémoglobine comme il a été présenté dans la première section.

Contrairement, à d'autres techniques comme la TEP ou l'IRMf, l'appareillage nécessaire pour un imageur optique intrinsèque est relativement simple (Fig. 1.6). Il nécessite une source de lumière non ponctuelle qui éclaire la zone à imager. Il doit être équipé d'une caméra CCD haute résolution dont la réponse spectrale permette de capter la lumière aussi bien dans le visible que dans l'infra rouge. L'ajout d'une lentille d'objectif donne la possibilité d'augmenter le grossissement mais aussi de réduire la profondeur de champ. Ce dernier critère est important car l'IOI souhaite imager les variations d'absorption dans les micro-vaisseaux situés sous la surface. Agir sur la profondeur de champ permet de réduire les contributions de signal dues aux macro-vaisseaux de la surface en les floutant dans l'image. Cette lentille permet donc de changer la profondeur de focalisation et donc mieux situer les changements d'absorption sous la surface.



**Figure 1.6 :** Illustration schématique de l'instrument d'IOI.

Une des premières études ayant tenté d'imager les signaux optiques intrinsèques présents dans la moelle épinière à la suite d'une stimulation est Asai et al. 2002 qui s'est concentré sur la racine dorsale. Cependant la capacité d'application de l'IOI à l'imagerie de la moelle épinière du rat suite à une stimulation des nerfs périphériques a été démontrée pour la première fois par Sasaki et al. (2002, 2003). Ces travaux se sont surtout concentrés sur l'activation présente dans la région cervicale en utilisant un nerf périphérique y ayant des projections. Ils ont montré que l'activation neuronale dans la moelle se trouvait du côté ipsilatéral contrairement au cerveau où l'activation est contralatérale au côté stimulé.

Plus récemment, Lesage et al. 2009 a mesuré par IOI la réponse hémodynamique au sein de la moelle épinière de rats non lésés et de rats lésés au niveau du dixième segment thoracique suite à une stimulation du nerf sciatique. Ce travail a mis en évidence la présence de différentes réponses hémodynamiques à la stimulation entre les deux groupes. Néanmoins, l'étude n'attribue pas ces différences à la seule réorganisation neuronale post-lésion, elle émet l'hypothèse que la réorganisation vasculaire autour de la lésion est aussi responsable de ces différences.

L'IOI a toutefois ses limites bien que cette modalité montre une bonne sensibilité ainsi qu'une bonne résolution spatiale ( $10 \sim 20 \mu\text{m}$ ). De plus elle permet d'obtenir des cartes d'activation neuronale bidimensionnelles assez précises à la surface dorsale de la moelle épinière. Néanmoins, l'IOI ne permet pas de distinguer le signal à différentes profondeurs. L'observation intègre la réponse en profondeur et sa sensibilité est de l'ordre de  $650 \mu\text{m}$ . Comme la moelle épinière d'un rat possède un diamètre d'environ 2 mm et que les motoneurones sont situés dans la zone ventrale de cette dernière, il n'est pas possible d'obtenir une information utile sur l'activation de ces derniers.

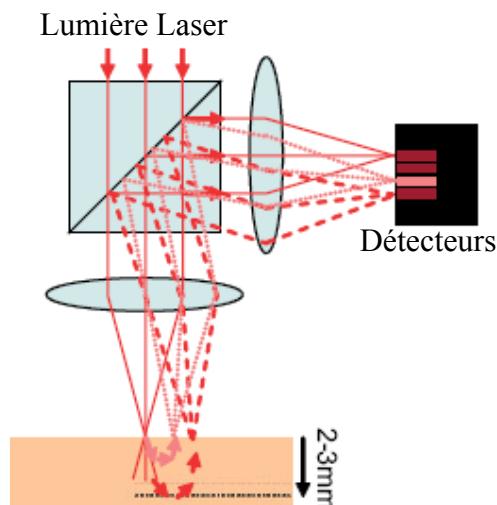
Le développement d'une modalité d'imagerie de la moelle épinière du rat qui soit sensible en profondeur est donc d'un grand intérêt.

### 1.2.5 Tomographie Optique Laminaire (TOL)

La tomographie optique laminaire (TOL) est une modalité d'imagerie fonctionnelle *in vivo* récemment développée. Les principes de base de la TOL furent présentés pour la première fois par Hillman et al. 2004. L'idée est d'utiliser une source de lumière ponctuelle à la surface du tissu à imager et de la déplacer rapidement. Une partie de cette lumière sera mesurée sur la même surface du tissu mais à différentes distances du point d'illumination. La capacité de la TOL d'effectuer de l'imagerie résolue en profondeur repose sur le fait que la lumière émergeant à plus grande distance a diffusé plus en profondeur (Arridge 1999, Dunn et Boas 2000). En mesurant l'intensité de la lumière pour plusieurs positions d'illumination et à différentes distances source-détecteur, il est possible de créer des images des structures présentes sous la surface. Dans cette mesure, la TOL ressemble à l'IOD sauf qu'en IOD les distances source-détecteur sont de l'ordre de 2 ou 3 cm alors qu'en TOL, elles sont de quelques mm.

Elle remplit donc le vide entre l'imagerie optique intrinsèque et l'imagerie optique diffuse. L'IOI permet, nous l'avons vu, une haute résolution mais peu de profondeur. L'IOD à l'inverse fournit des informations en profondeur ( $\sim 2.5 \text{ cm}$ ) mais avec une résolution

spatiale très limitée ( $\sim 1\text{cm}$ ). La TOL avec une résolution d'une centaine de microns et une profondeur d'observation d'environ 3 mm représente donc une modalité intermédiaire. Elle peut être utilisée pour observer des contrastes aussi bien d'absorption que de fluorescence. En ce qui concerne l'appareillage, comme l'IOI, un imageur optique linaire nécessite une source d'éclairage (diode laser) mais cette fois ponctuelle. Il n'est pas équipé d'une caméra CCD mais de photo-détecteurs discrets. Un jeu de plusieurs lentilles fait office d'objectif (Fig. 1.7).



**Figure 1.7 :** Illustration schématique de l'instrument de TOL.

Plusieurs études ont déjà utilisé la TOL : dans Hillman et al. 2007a, la TOL a permis l'imagerie fonctionnelle 3D du cortex du rat sans contact. Ce travail a mené à l'établissement d'une carte tridimensionnelle des contributions capillaire, veineuse et artérielle de la réponse hémodynamique du cortex à une stimulation.

Dans Hillman et al. 2007b, la TOL a été utilisée afin d'imager en 3D la propagation électrique transmurale dans le cœur d'un rat mis sous perfusion.

Enfin, Hillman et Burgess 2009 fournit une revue complète de toutes les applications de la TOL et l'utilise pour une application humaine qui est l'imagerie de lésions cancéreuses de

la peau. En utilisant les possibilités d'observation des contrastes d'absorption et de fluorescence, la TOL permet de mettre en évidence l'organisation anarchique du réseau vasculaire d'une tumeur.

On peut se rendre compte des différentes possibilités qui se présentent pour imager la moelle épinière. Cette revue de littérature montre que les techniques d'IRMf ou d'IOI se révèlent être des outils puissants pour mesurer l'activation neuronale mais que dans le cas de la moelle épinière, elles se heurtent à des contraintes qui limitent leur performance. En effet, l'IRMf manque de sensibilité et de résolution temporelle alors que l'IOI ne peut pas fournir d'informations sur un volume. On constate d'ailleurs que l'imagerie de l'activité fonctionnelle de la moelle en trois dimensions n'a jamais abouti jusqu'à présent. Or, cette application semble être absolument nécessaire pour mieux appréhender la plasticité neuronale de la moelle. En utilisant de petits animaux comme le rat, la TOL semble représenter la modalité la plus appropriée pour obtenir des informations supplémentaires qui permettraient enfin d'établir des cartes tridimensionnelles avec une résolution suffisamment satisfaisante pour localiser les foyers d'activation avec précision.

## CHAPITRE 2

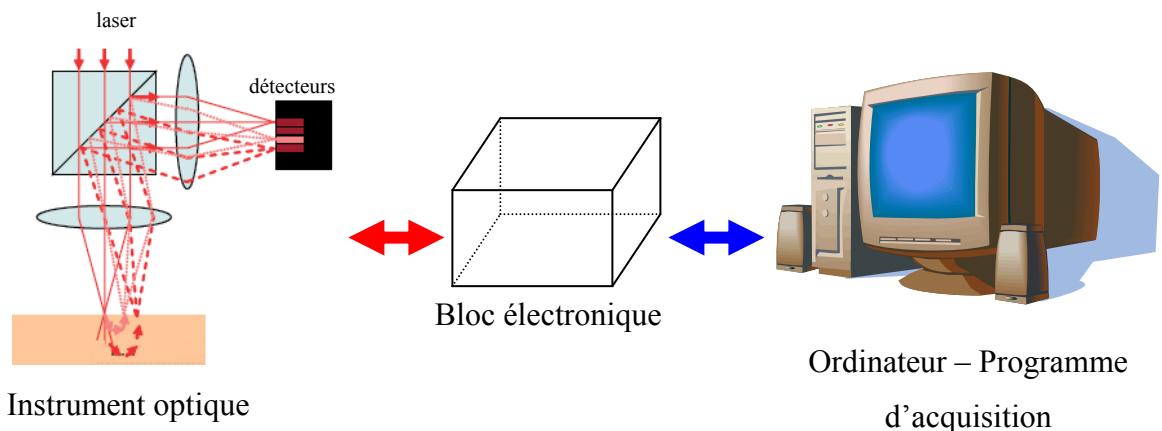
# L'INSTRUMENT DE TOMOGRAPHIE OPTIQUE LAMINAIRE

Dans ce chapitre, le fonctionnement de l'imageur TOL développé dans le cadre de ce mémoire est décrit en présentant chaque bloc de ce dernier. Cette modalité d'imagerie étant récente, il n'existe pas d'appareils commerciaux. La majeure partie du projet a donc été la conception d'un prototype adapté aux besoins de l'imagerie de la moelle épinière du rat.

L'imageur TOL comporte principalement trois blocs opérationnels :

- un bloc optique,
- un bloc informatique,
- un bloc électronique.

Une illustration schématique de l'imageur est donnée à la figure 2.1.



**Figure 2.1 :** Illustration schématique de l'instrument d'imagerie.

## 2.1 L'instrument optique

Le système optique pour la TOL a été construit en utilisant des composants optoélectroniques standards. Il a été réalisé dans le but d'être compact ( $20 \times 25 \times 40 \text{ cm}^3$ ) et relativement rigide afin de faciliter l'alignement de nos rayons lumineux tout en gardant la possibilité d'être modifiable. La totalité des composants ainsi que leur disposition sont montrées à la figure 2.2 qui contient une photographie de notre système actuel. Pour faciliter la compréhension du lecteur, il est conseillé de se référer aux quelques rappels théoriques d'optique géométrique qui sont disponibles en Annexe 1.

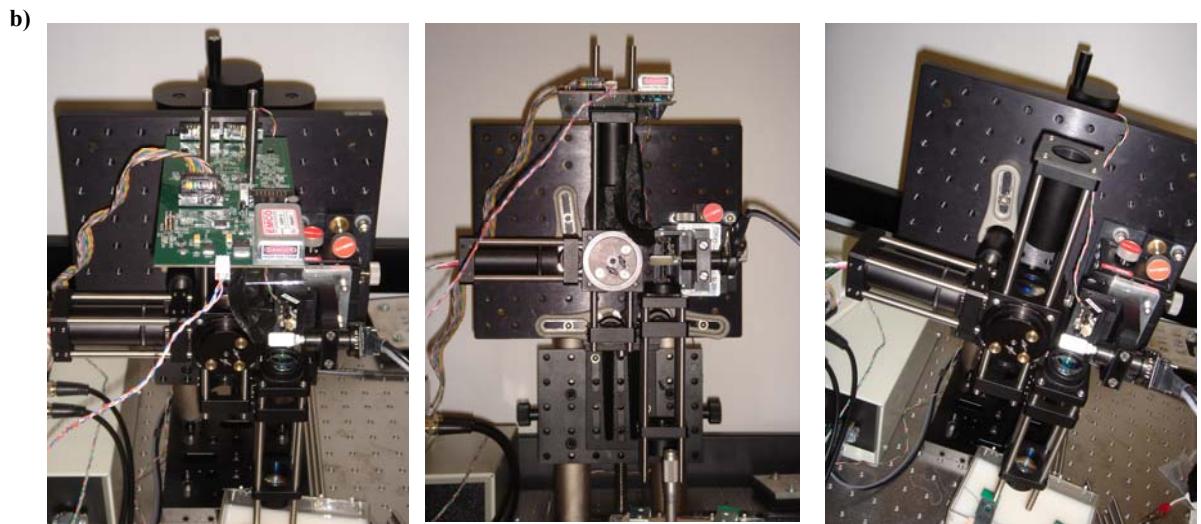
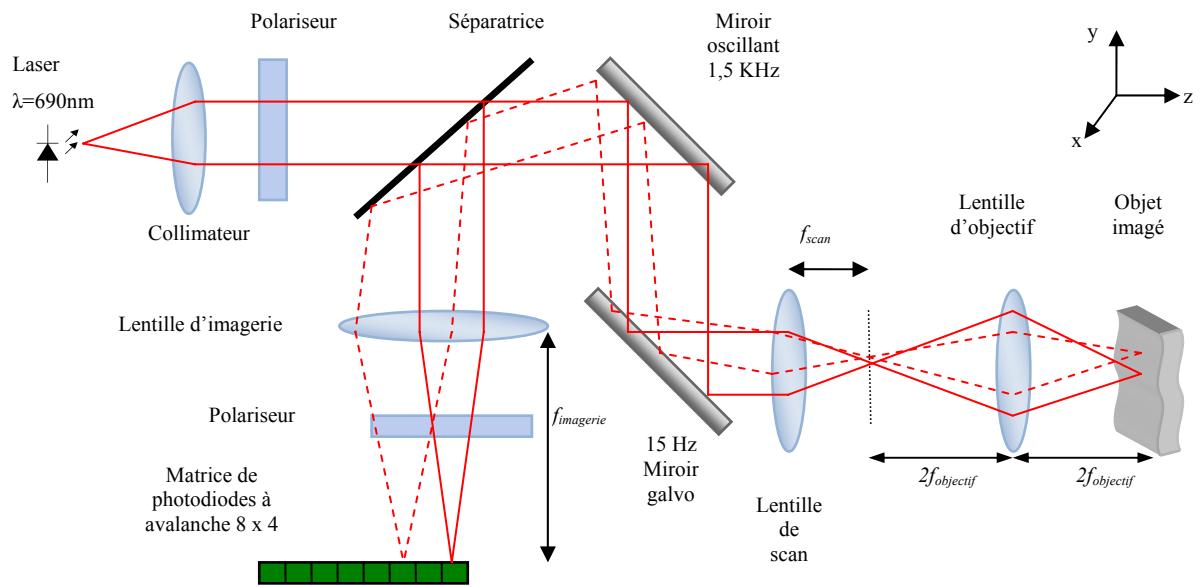
### 2.1.1 Le trajet de la lumière

La source lumineuse utilisée pour cet imageur est une diode laser de longueur 690 nm (visible) et de puissance maximale 35 mW (HL6738MG, Hitachi Optnext). Cette diode laser opère en mode continu, par conséquent l'illumination de la zone à imager durant une acquisition est ininterrompue.

Dans la mesure où cette zone doit être illuminée avec une source ponctuelle, la diode est placée dans un collimateur (LT220P-B, Thorlabs) afin d'obtenir un faisceau parallèle de très faible diamètre (de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ ). Un collimateur est en réalité un tube équipé d'une lentille qui fait converger les rayons issus de la diode vers son axe de symétrie qu'on appellera dorénavant l'axe optique.

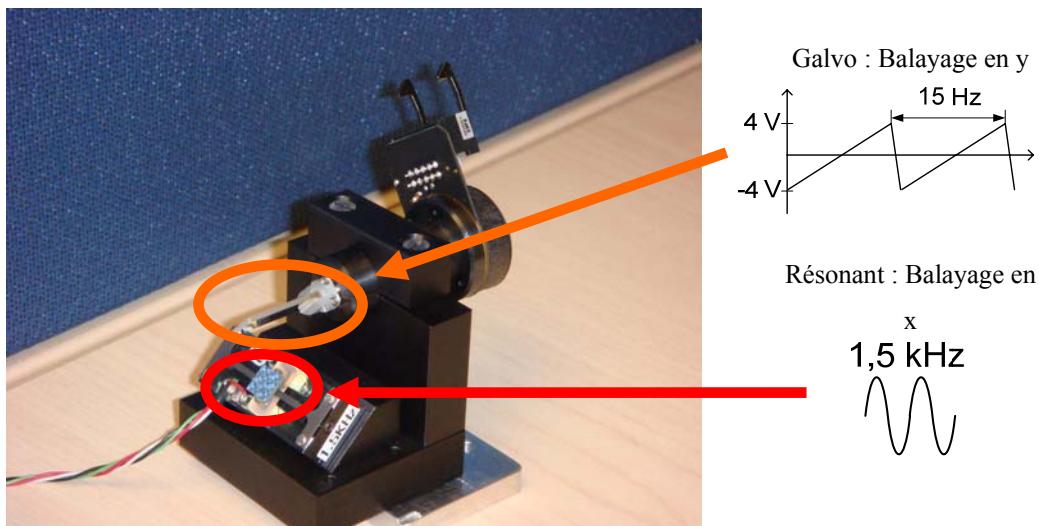
La lumière générée par la diode laser étant non polarisée, le faisceau émergeant du collimateur passe au travers d'un polariseur (NT47-316, Edmund Optics) afin d'obtenir une lumière p-polarisée. Le faisceau traverse alors une lame séparatrice de ratio 50 : 50 (Y43736, Edmund Optics) laissant ainsi passer une moitié du faisceau tout en rejetant l'autre. Cet élément est très important pour recueillir le faisceau de retour.

Le faisceau vient alors frapper un premier miroir oscillant à 1,5 kHz qui effectue le balayage de la lumière sur la dimension x. Il est alors envoyé sur un miroir à galvanomètre pivotant à une fréquence de 15 Hz (Cambridge Technology, Fig. 2.3).



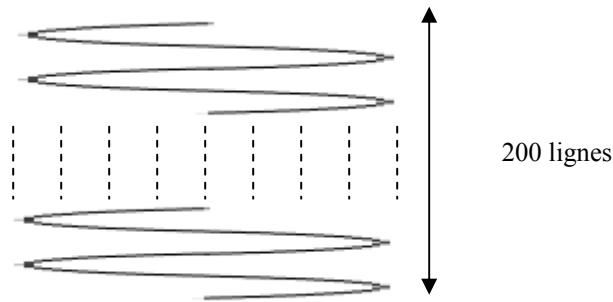
**Figure 2.2 :** a) Trajet de la lumière, b) Photographies de l'imageur optique avec et sans la plaque de détecteurs.

Ce miroir effectue donc un balayage du faisceau sur la dimension y. Une lentille convergente (LB1761-B, Thorlabs) placée juste après ce miroir, que l'on nomme lentille de scan, conjugue la lumière en son plan focal qui se trouve à la distance focale  $f_{scan}$  du centre optique de la lentille. Dans la mesure où les miroirs pivotent, ils changent l'angle du faisceau laser parallèle ce qui induit que le point lumineux conjugué bouge selon un patron bidirectionnel (Fig. 2.4) dans le plan focal image de cette lentille (d'où le terme balayage). On utilise ensuite une lentille dite d'objectif (LB1471-B, Thorlabs) dans le but de créer une image selon ce patron lumineux sur la surface de l'animal ou du fantôme analysé.



**Figure 2.3 :** Photographie des miroirs pivotants avec leurs réponses temporelles.

La création de ce patron s'effectue lors d'un cycle complet du miroir à galvanomètre pivotant à 15 Hz suivant une réponse en rampe de -4V à +4V. Le miroir résonant qui oscille à la fréquence de 1,5 kHz de -2V à +2V a le temps d'effectuer  $1500 / 15 = 100$  périodes de rotation. Lors d'une de ces périodes, 2 lignes du patron sont créées. Par conséquent, le patron lumineux se définit comme un parcours sinusoïdal de 200 lignes. Comme la fréquence de rotation du miroir à galvanomètre est de 15 Hz, les images générées selon le patron se forment à un taux de 15 images / seconde.



**Figure 2.4 :** Patron d'une image créée par l'imageur TOL.

La lumière retournée vers les détecteurs ayant diffusé dans l'échantillon emprunte le même chemin optique en sens inverse. Elle repasse par les lentilles d'objectif et de scan et frappe les 2 miroirs qui effectuent ainsi une opération de « dé-balayage ». La lumière atteint alors la lame séparatrice qui va laisser passer la moitié du signal mais qui va réfléchir l'autre moitié vers le système de détection. Cette moitié de signal réfléchie va franchir une lentille dite d'imagerie (LB1676-B, Thorlabs) qui va produire une image du point lumineux conjuguée en son plan focal dans lequel on a placé une matrice de photodiodes à avalanche de 32 détecteurs (4 lignes de 8 détecteurs, une seule ligne est utilisée par la suite) (S8550, Hamamatsu, Fig. 2.5). Comme la lumière est « dé-balayée », le point lumineux en question reste stationnaire dans le plan focal d'imagerie. Il suffit alors d'aligner ce point lumineux sur le premier détecteur d'une des quatre lignes de la matrice de photodiodes qui transforme le signal optique en signal électrique pour chaque point du patron de balayage. Les 8 détecteurs étant équidistants deux à deux, il est alors possible de générer des images de la zone balayée sur 8 tranches de profondeurs différentes elles-aussi équidistantes deux à deux sur la dimension z.

Le signal de retour est composé de la lumière issue de la réflexion spéculaire ainsi que de la lumière diffusée dans le volume analysé. La première va maintenir sa p-polarisation vu qu'elle provient de la réflexion directe à l'interface air/surface, la seconde est un mélange de lumière p-polarisée et s-polarisée (Yuan et al. 2009). Dans le cas de l'imageur, il ne faut pas conserver la lumière p-polarisée car elle n'a finalement pas pénétré dans l'échantillon

que l'on souhaite analyser. Ainsi en termes de changements d'absorption, cette partie du signal n'apporte aucune information, elle est même néfaste car elle introduit du bruit au sein des images. Pour supprimer les effets de la réflexion spéculaire, un second polariseur de même modèle que le premier est placé entre la matrice et la lentille d'imagerie pour ne récupérer que la lumière s-polarisée.



**Figure 2.5 :** Matrice de photodiodes à avalanche.

Le paragraphe suivant caractérise quantitativement le grandissement de notre système optique ainsi que son champ de vision.

### 2.1.2 Formation d'image et grandissement

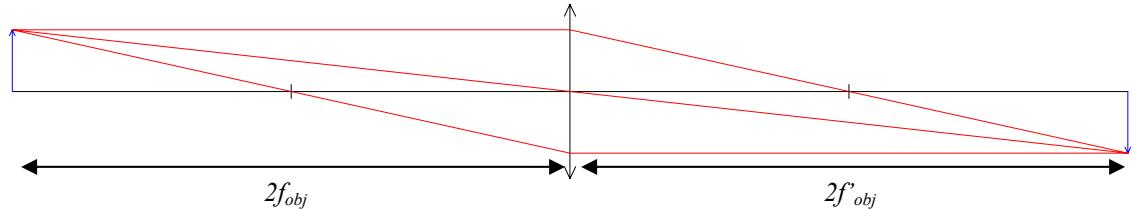
Le patron d'image se forme juste après la lentille de scan dans son plan focal. La taille de ce patron dans chacune des directions, autrement dit le champ de vision de l'imageur TOL, est déterminée par la formule suivante :

$$d_{\text{dim}} = m_{\text{obj}} f_{\text{scan}} \tan(2\theta_{\text{miroir}}) \quad 2.1$$

où  $d_{dim}$  représente la taille de l'image dans une dimension,  $f_{scan}$  est la focale de la lentille de scan,  $\theta_{miroir}$  est l'angle de rotation du miroir selon la dimension de balayage considérée et  $m_{obj}$  est le grandissement de l'image introduit par la lentille d'objectif.

Le champ de vision dépend donc de trois paramètres dont la valeur peut être fixée pour chacun suivant les besoins de l'imagerie.

Dans le cas de ce travail, il a été décidé de ne pas introduire de grandissement avec la lentille d'objectif, i.e. fixer  $m_{obj} = 1$ . Pour réaliser cela, la lentille d'objectif est placée vis-à-vis du patron formé après la lentille de scan à une distance deux fois égale à sa focale  $d = 2f_{objectif}$ . L'instrument optique doit alors être placé au-dessus du volume imagé de manière à ce que la lentille d'objectif et la surface du volume soient elles-aussi séparées de la distance  $d$  pour obtenir un grandissement de 1 (Fig. 2.6).



**Figure 2.6 :** Illustration des rayons lumineux pour un grandissement optique de 1.

D'après les relations de conjugaisons (l'optique géométrique utilise des distances algébriques), nous avons :

$$\frac{1}{\overline{OA'}} - \frac{1}{\overline{OA}} = \frac{1}{f'_{objectif}} \Leftrightarrow \overline{OA'} = \frac{\overline{OA} \times f'_{objectif}}{\overline{OA} + f'_{objectif}}, \quad 2.2$$

or

$$\overline{OA} = 2f_{objectif}, \quad 2.3$$

$$f_{objectif} = -f'_{objectif},$$

par conséquent

$$\overline{OA'} = \frac{2f_{objectif} \times f'_{objectif}}{2f_{objectif} + f'_{objectif}} = \frac{-2f'^2_{objectif}}{-f'_{objectif}} = 2f'^2_{objectif}. \quad 2.4$$

La valeur du grandissement d'objectif est donc :

$$m_{obj} = \left| \frac{\overline{A'B'}}{\overline{AB}} \right| = \left| \frac{\overline{OA'}}{\overline{OA}} \right| = \left| \frac{2f'^2_{objectif}}{2f_{objectif}} \right| = 1. \quad 2.5$$

Actuellement, l'imageur TOL est équipé d'une lentille de scan de focale  $f_{scan} = 25,4$  mm. Le miroir à galvanomètre à 15 Hz possède une amplitude de rotation de 20 °. Quant au miroir résonant, il peut pivoter de 10 °. Ainsi le champ de vision théorique de l'imageur est le suivant :

- $d_x = 9,2$  mm
- $d_y = 21,3$  mm

Maintenant que la taille de notre patron sur la surface du volume imposé est connue, il ne reste plus qu'à calculer la séparation source-détecteur sur cette même surface. Pour cela, il faut d'abord chercher le grandissement total du système qui ne dépend donc que de la lentille d'imagerie et de la lentille de scan.

La matrice de photodiodes est placée dans le plan focal de la lentille d'imagerie, par conséquent son image réelle se retrouve à une distance infinie. Cette image à l'infini

devient l'objet optique à imager pour la lentille de scan. Cet objet étant virtuel pour la lentille de scan, il se forme alors une image réelle de celui-ci dans le plan focal image de la lentille de scan. Afin d'obtenir comme grandissement total le rapport des deux focales, il est nécessaire de séparer les lentilles centre à centre de la distance  $d = f_{imagerie}$ .

La distance optique totale parcourue par la lumière de retour est donc égale à :

$$d_{totale} = 4f_{objectif} + f_{scan} + f_{imagerie} = 4 \times 50 + 25,4 + 100 = 325,4 \text{ mm} \quad 2.6$$

En appliquant le théorème de Thalès aux deux triangles semblables, le grandissement total obtenu est

$$\gamma = \left| \frac{\overline{A_{ph}B_{ph}}}{\overline{A'_{ph}B'_{ph}}} \right| = \left| \frac{\overline{O_{obj}A_{ph}}}{\overline{O_{obj}O_{scan}}} \right| \Leftrightarrow \gamma = \frac{f_{objectif}}{f_{scan}}. \quad 2.7$$

Comme le système actuel utilise une lentille d'objectif de focale 100 mm, le grandissement du système est égal à  $\gamma = 4$ . Par conséquent, la distance source-détecteur est 4 fois plus petite dans le plan du patron qu'elle ne l'est sur la matrice de photodiodes. Chaque détecteur sur la matrice étant séparé de 2,3 mm, la distance d'un détecteur à l'autre dans le plan du patron est de  $2,3 / 4 = 575 \mu\text{m}$ .

**Tableau 2.1 :** Distances source-détecteur.

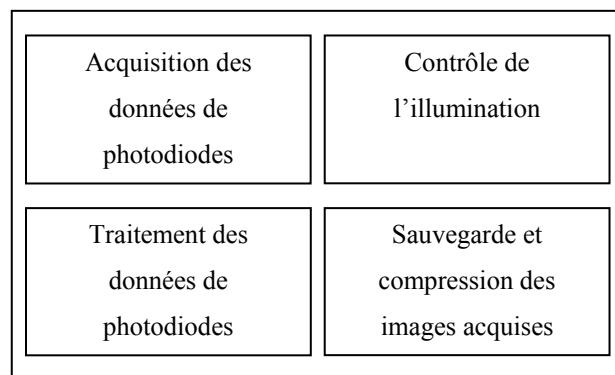
	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8
distance source-détecteur sur la matrice (mm)	0	2,3	4,6	6,9	9,2	11,5	13,8	16,1
distance source-détecteur sur le patron (mm)	0	0,575	1,15	1,725	2,3	2,875	3,45	4,025

On s'assurera de ces résultats théoriques en caractérisant expérimentalement l'imageur dans le chapitre 4.

Le bloc optique crée des patrons d'image en illuminant la surface du volume à analyser et détecte les changements d'absorption de la lumière au sein de l'échantillon sur plusieurs tranches de profondeur différente. Le bloc informatique, lui, est chargé de contrôler l'acquisition des données générées par le bloc optique. La section suivante décrit sommairement l'interface développée.

## 2.2 L'instrument virtuel

L'acquisition des données récoltées par les photodiodes à avalanche doit se faire en temps réel. La solution informatique adoptée pour satisfaire cette condition est le logiciel de programmation graphique et d'instrumentation virtuelle LabView de National Instruments. L'instrument développé régit l'acquisition des différents canaux de photodiodes et des réponses temporelles des miroirs accessibles par leur console de commande. Comme l'acquisition des données du patron se fait point par point, il faut les réaligner dans une matrice afin de former des images cohérentes et les sauvegarder. Enfin, le dernier rôle de l'instrument virtuel est le contrôle de l'illumination.



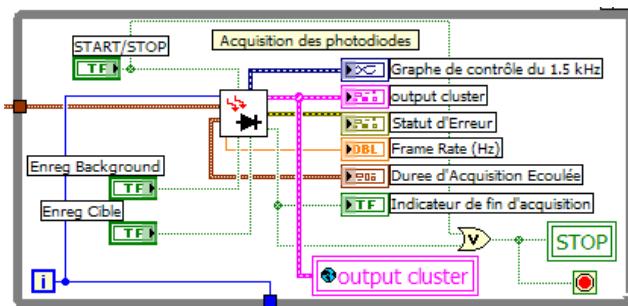
**Figure 2.7 :** Schéma-bloc opérationnel du code d'acquisition.

Le matériel associé qui permet d'effectuer toutes ces opérations est une carte d'acquisition PCI-6143 National Instruments à 8 canaux analogiques +5V/-5V, 8 Entrées/Sorties numériques TTL avec une résolution d'encodage de 16 bits et une fréquence d'échantillonnage maximale de 250 kHz par canal.

Les paragraphes suivants présentent chaque bloc de l'instrument virtuel sans entrer dans les détails de programmation.

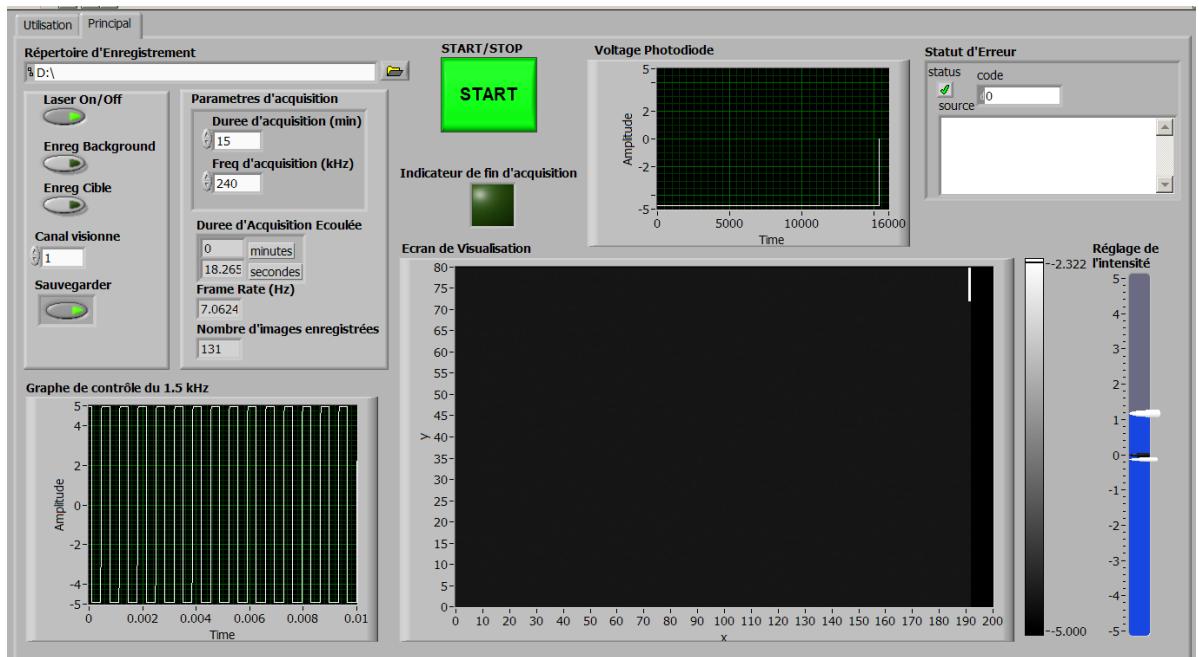
### 2.2.1 L'acquisition des données de photodiodes

La formation d'une image correspondant à une période de miroir à galvanomètre à 15 Hz, l'acquisition des données délivrées par les photodiodes est synchronisée avec ce miroir. Sa réponse temporelle étant une rampe dont la pente descendante est très courte, c'est donc sur la pente ascendante que la totalité du patron lumineux se crée. La synchronisation se fait donc sur le front descendant de la réponse du miroir. Sur le plan matériel, la carte PCI-6143 peut synchroniser l'acquisition des données analogiques sur une des 8 Entrées/Sorties numériques qui n'acceptent que des signaux TTL. Il faut donc transformer la réponse en rampe du miroir en une horloge numérique TTL qui est un signal carré oscillant de 0V à +5V. Les données acquises sont alors rangées dans un vecteur ligne pour chaque canal analogique correspondant à une photodiode particulière (Fig. 2.8).



**Figure 2.8 :** Bloc d'acquisition des données de photodiodes.

L'interface graphique mise au point (Fig. 2.9) permet de choisir la durée d'acquisition et surtout la fréquence d'acquisition qui va permettre de prendre plus ou moins de points dans une image selon la convenance de l'utilisateur. En effet, la carte PCI-6143 permet d'effectuer des acquisitions pouvant aller jusqu'à 250000 échantillons par seconde et par canal, soit  $250000 / 15 = 16666$  pixels maximum par image acquise. Pour laisser une période de quelques ms entre chaque acquisition d'image, il est préférable de travailler à 240 kHz de fréquence maximale soit 16000 pixels par image. Cela libère un peu de mémoire vive et ajoute de la robustesse au code.



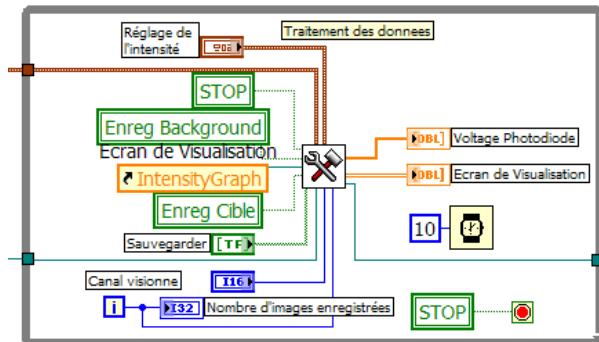
**Figure 2.9 :** Interface graphique d'utilisation de l'instrument virtuel.

## 2.2.2 Le traitement et la sauvegarde des données

La résolution sur la dimension y ne dépend pas de l'informatique, elle est inhérente aux caractéristiques des miroirs. Un patron contient 200 lignes, par conséquent une image

contient 200 pixels sur la dimension y. La résolution en x est fixée par l'utilisateur lorsqu'il choisit la fréquence d'acquisition, autrement dit le nombre de pixels par image. À la fréquence maximale de 240 kHz, la résolution en x est donc de  $16000 / 200 = 80$  pixels.

Les images les plus résolues seront donc de 80 par 200 pixels. Néanmoins, les 16000 valeurs de pixel acquises sont rangées dans un vecteur. Pour les réaligner dans une matrice de 80 colonnes par 200 lignes afin de reformer une image à l'écran, l'information de position angulaire du miroir résonant à 1,5 kHz est utilisée. Pour chaque valeur de pixel acquise sur les différents canaux analogiques, le code vérifie la valeur de la position angulaire. Les valeurs sont placées d'un côté ou de l'autre de la matrice selon que la valeur de la réponse temporelle soit inférieure ou supérieure à 0V.



**Figure 2.10 :** Bloc de traitement des données de photodiodes.

Comme on effectue la comparaison vis-à-vis du seuil 0V, il est préférable de transformer la réponse temporelle sinusoïdale du miroir résonant en un signal électrique carré, autrement dit une horloge. Néanmoins, on ne peut pas utiliser une des E/S numériques car la fréquence d'acquisition de ces valeurs d'horloge doit être la même que celle des valeurs de photodiodes. Hors, les E/S numériques sont limitées en fréquence et ne peuvent pas acquérir jusqu'à 240 kHz. Par conséquent, on doit faire l'acquisition de cette horloge sur un des 8 canaux analogiques ce qui signifie perdre l'information délivrée par une photodiode. Les données de seulement 7 détecteurs pourront être enregistrées. Étant donné les profondeurs d'observation recherchées, c'est un compromis que l'on peut se permettre.

Ce bloc de traitement permet de visualiser à l'écran d'ordinateur les images en temps réel avec un taux effectif de 7,5 images par seconde lorsqu'on fonctionne à résolution maximale. Le taux théorique de 15 Hz fixé par le miroir à galvanomètre n'est pas respecté car l'algorithme du code en LabView reste lourd, il demande une trop forte allocation de mémoire vive. Par conséquent, on ne détecte qu'un front descendant d'horloge à 15 Hz sur deux. Dès que l'on diminue la fréquence d'acquisition, ce taux augmente instantanément. Il faut donc choisir entre la résolution de l'image et le taux d'acquisition. Dans le cadre de ce projet, un taux de 7,5 images par seconde est suffisant car les variations de concentrations en HbO et HbR, donc les variations d'absorption, dans le cortex et la moelle sont maximales cinq à six secondes après la stimulation, (Valabrege 2003, Sasaki et al. 2002). Finalement, les images réalignées sortant de ce bloc de traitement sont ensuite enregistrées au format 16 bits et compressées dans des fichiers ayant l'extension .bin. Une minute d'acquisition génère environ 95 Mo de données.

### 2.2.3 Le contrôle de l'illumination

La dernière opération que l'utilisateur peut contrôler par informatique est l'illumination de la source laser. Ce dernier bloc est très simple, il a été conçu pour contrôler 4 diodes laser différentes dans la prévision de convertir l'imageur TOL actuel à une longueur d'onde en imageur multi-ondes. Il utilise 4 E/S numériques de la carte PCI-6143 qui peuvent délivrer un signal TTL 0-5V. Les signaux TTL étant par défaut à l'état logique haut (+5V), l'utilisateur ne choisit pas en réalité d'allumer les diodes laser mais plutôt de les éteindre en imposant aux sorties numériques l'état logique bas (0V).

Cette dernière section a décrit comment l'informatique permet de contrôler l'acquisition mais il semble donc nécessaire de transformer certains signaux afin qu'ils soient compatibles avec le matériel National Instruments ainsi que les exigences algorithmiques

du code. La prochaine section se propose donc de décrire l'interface électronique qui fait le lien entre l'instrument optique et l'instrument virtuel informatique.

## 2.3 L'interface électronique

La figure 2.11 suivante est un schéma-bloc de l'interface électronique.

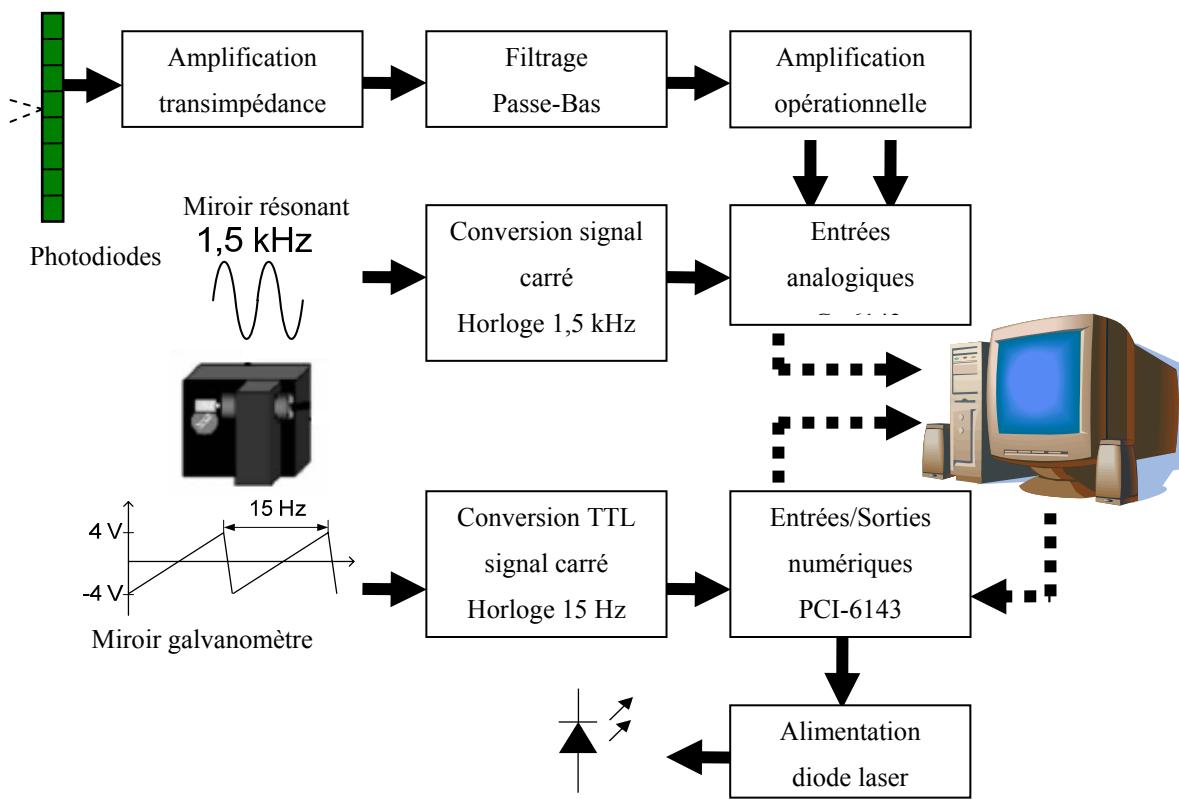


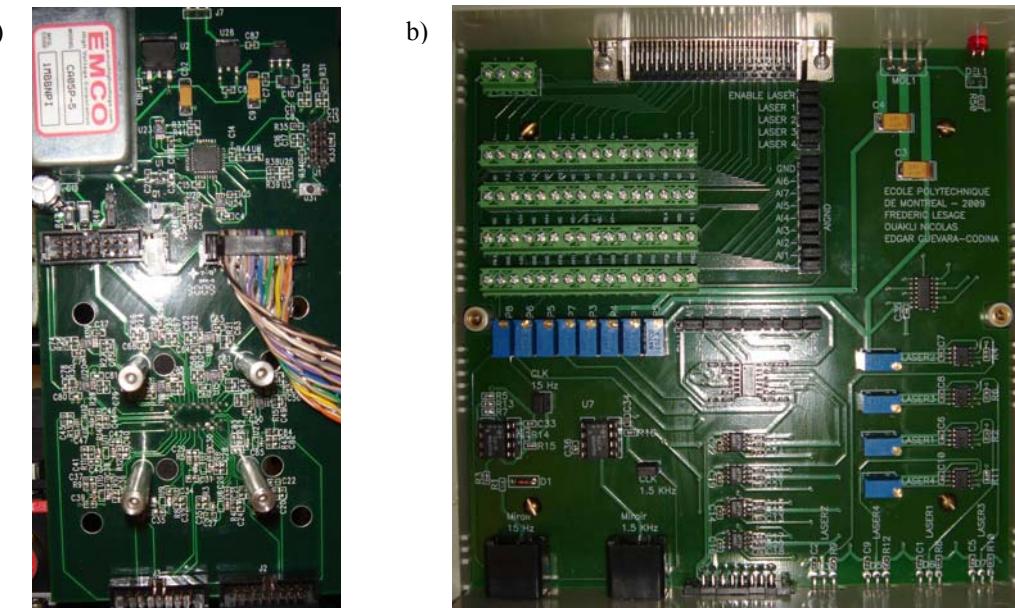
Figure 2.11 : Schéma-bloc opérationnel de l'interface électronique.

La matrice de photodiodes à avalanche transforme l'intensité optique reçue par ses détecteurs en un courant électrique. La carte d'acquisition PCI-6143, elle, ne peut faire l'acquisition que de potentiels électriques sur ses canaux analogiques. Par conséquent, un

étage d'amplification transimpédance est nécessaire pour convertir ce courant en tension électrique. Les signaux de tensions électriques obtenus sont ensuite filtrés par un filtre passe-bas. Un étage d'amplification opérationnelle est ajouté pour utiliser toute la plage de -5V à +5V disponible sur les canaux analogiques de la carte d'acquisition. Cela permet d'effectuer un encodage plus résolu des données.

Chacun des deux miroirs délivre une sortie temporelle. La sortie sinusoïdale de -2V à +2V du miroir résonant à 1,5 kHz est convertie en un signal carré de même fréquence de -5V à +5V que l'on envoie sur un des canaux analogiques de la carte d'acquisition. La sortie en rampe du miroir à 15 Hz de -4V à +4V, est convertie en un signal carré de même fréquence et redressée de 0V à +5V car on l'injecte sur une des E/S numériques TTL.

Enfin, l'utilisateur de l'instrument virtuel peut contrôler l'illumination, la carte PCI-6143 délivrant un signal qui permet à un circuit d'alimentation de fournir du courant à la diode laser. Ces différentes fonctions sont assurées par deux circuits imprimés différents (Fig. 2.12) qui sont des prototypes développés au cours du projet.

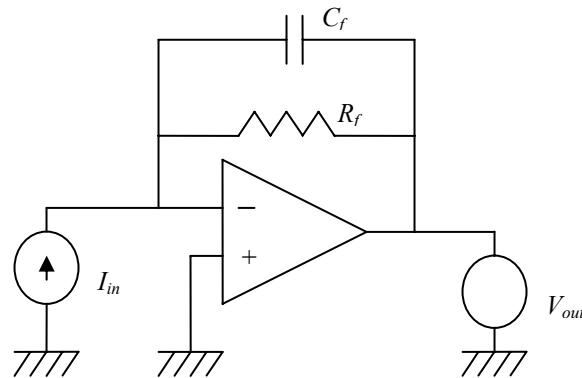


**Figure 2.12 :** a) Circuit de la matrice de photodiodes avec étage amplification transimpédance, b) Circuit établissant la connexion entre la carte National Instruments et le circuit a) et assurant les autres opérations de l'interface électronique.

Chaque bloc va maintenant faire l'objet d'une description aussi bien sur le plan théorique que celui des solutions matérielles adoptées.

### 2.3.1 L'amplification transimpédance

Le rôle de cet étage d'amplification est de transformer le courant électrique délivré par les photodiodes à avalanche en tension électrique. Pour cela, on utilise un amplificateur transimpédance qui est un amplificateur opérationnel utilisant une contre-réaction en courant (Figure 2.13).



**Figure 2.13 :** Schéma électrique amplificateur transimpédance.

La résistance de contre-réaction  $R_f$  détermine le gain de l'amplificateur, quant à la capacité de contre-réaction  $C_f$ , elle est utilisée pour assurer la stabilité du signal.

La tension de sortie est déterminée par la formule suivante :

$$V_{out} = -R_f \times I_{in} \quad 2.8$$

Pour implémenter ce schéma, un amplificateur commercial à très bas bruit (LTC6244HV, Linear Technologies) a été choisi. Le fabricant préconise l'utilisation d'une capacité de contre-réaction de 1 pF et de ne pas dépasser une valeur de résistance de contre-réaction

supérieur à  $5 \text{ M}\Omega$ , ce qui équivaut à un gain de  $5 \times 10^6$ . Dans notre cas, le gain est ajusté pour chaque détecteur avec la valeur de  $R_f$  qui croît avec la distance de séparation de ce dernier vis-à-vis de la source. En effet, plus le détecteur est éloigné, moins l'intensité du signal optique qu'il reçoit est importante. Le gain a donc été ajusté ainsi :  $G = 6,25 \times 10^5$  pour les détecteurs 1 et 2,  $G = 1,25 \times 10^6$  pour les détecteurs 3 et 4,  $G = 2,5 \times 10^6$  pour les détecteurs 5 et 6,  $G = 5 \times 10^6$  pour les détecteurs 7 et 8.

### 2.3.2 Le filtrage passe-bas des données

Le signal optique et par conséquent le signal électrique post-transimpédance délivré par les photodiodes est un signal analogique. L'instrument virtuel fait l'acquisition de 16000 points par image à la fréquence d'échantillonnage de 240 kHz. Il convertit donc ce signal analogique en signal numérique.

Or, le théorème de Nyquist-Shannon énonce que pour convertir un signal analogique vers une forme numérique, la fréquence d'échantillonnage doit être supérieure ou égale au double de la fréquence maximale contenue dans ce signal.

Dans ce cas précis, la fréquence d'échantillonnage est fixée à 240 kHz. Comme tout échantillonnage doit être précédé d'un filtrage, par conséquent, avant de reformer une image, le signal de photodiodes doit être filtré en ne gardant que les fréquences inférieures ou égales à 120 kHz afin de respecter le théorème de Nyquist-Shannon. Effectuer cette opération permet de prévenir des éventuels effets de repliement dans le signal numérique utilisé pour réaligner les images.

Cette opération de filtrage est implémentée par un circuit électronique commercial (LTC1569-7, Linear Technologies) qui est un filtre passe-bas du 10<sup>ème</sup> ordre (très haute précision) dont la fréquence de coupure théorique est  $F_c = 128 \text{ kHz}$  et dont le gain est unitaire. L'atténuation théorique de ce filtre est de 60 dB à partir de  $2F_c = 256 \text{ kHz}$  et elle excède les 80 dB dès que la fréquence est supérieure à  $6F_c = 768 \text{ kHz}$ .

Pour s'assurer des performances de chaque filtre, des tests expérimentaux ont été effectués sur les 8 canaux en injectant en signal d'entrée une onde carrée de fréquence  $F$  et d'amplitude 1V qui se définit comme la composition d'une onde sinusoïdale fondamentale de fréquence  $F$  et d'une infinité d'harmoniques d'ordre impair dont la fréquence est un multiple de  $F$  suivant l'ordre de l'harmonique.

Pour  $F < 115$  kHz, le résultat obtenu est une onde sinusoïdale, l'onde fondamentale, dont l'amplitude n'a pas changé vis-à-vis de l'onde carrée. Le gain du filtre est donc bien unitaire. Dès que l'on dépasse  $F = 115$  kHz, on continue de ne récupérer que le fondamental mais l'amplitude diminue très rapidement. À partir de  $F = 180$  kHz, le signal récupéré en sortie du filtre est quasiment nul. Cela tend à confirmer l'atténuation très forte du filtre à 60 dB.

La fréquence de coupure mesurée pour chaque filtre est d'environ 122,5 kHz. C'est inférieur à la fréquence de coupure annoncée par le fabricant mais bénéfique pour l'imageur dont la fréquence d'échantillonnage est fixée à  $F_e = 240$  kHz. En effet, 122,5 kHz est plus proche de  $\frac{F_e}{2}$  que 128 kHz.

### 2.3.3 L'amplification opérationnelle des données filtrées

Les canaux analogiques de la carte PCI-6143 ont une plage opérationnelle de +5V à -5V. Afin de pouvoir utiliser toute la plage disponible sur chaque canal, les signaux obtenus après le filtrage sont amplifiés. Cela permet une meilleure utilisation de l'encodage des données sur 16 bits. Cette amplification est assurée par un amplificateur opérationnel monté en amplificateur inverseur (Fig. 2.14). Le signal d'entrée est donc multiplié par un gain négatif. La conséquence du signe négatif sur les images est que la carte de couleur va être inversée. Cela ne pose aucun problème vu que c'est un contraste que l'imageur permet d'observer. Afin de recentrer le signal, on ajoute en entrée de l'amplificateur une résistance variable afin de pouvoir régler la tension de décalage.

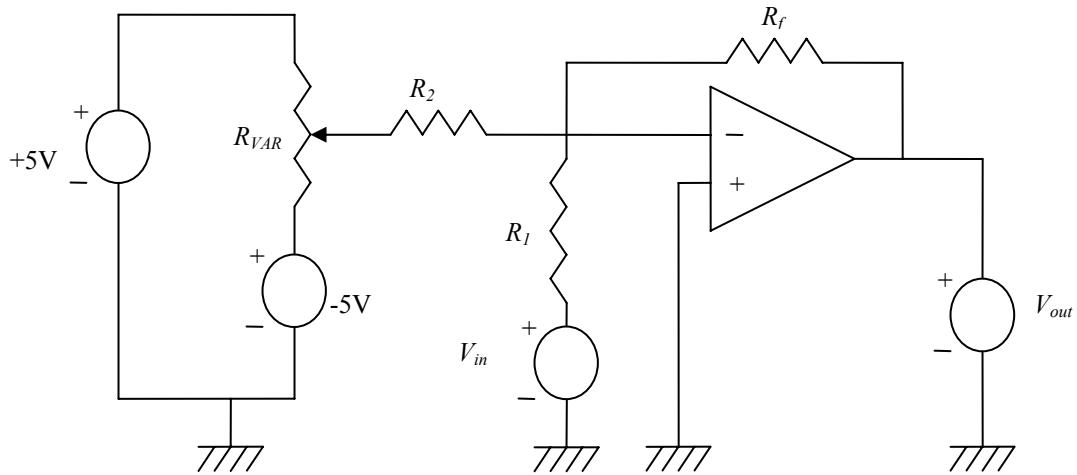


Figure 2.14 : Schéma électrique amplificateur inverseur avec réglage du décalage.

On calcule la tension de sortie en appliquant le théorème de Millman relatif aux branches de courant. C'est une forme particulière de la loi des nœuds exprimée en termes de potentiels.

$V^-$  et  $V^+$  étant respectivement les potentiels de l'entrée négative et positive :

$$V^- = \frac{\frac{(5 - (-5)) \times K}{R_2} + \frac{V_{in}}{R_1} + \frac{V_{out}}{R_f}}{\frac{1}{R_2} + \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_f}} \quad 2.9$$

$$V^+ = 0$$

Avec  $K$  étant une constante comprise entre 0 et 1 déterminée par la résistance variable que l'utilisateur peut ajuster à sa convenance afin de compenser la tension de décalage.

Par conséquent

$$\frac{10K}{R_2} + \frac{V_{in}}{R_1} + \frac{V_{out}}{R_f} = 0, \quad 2.10$$

$$V_{out} = -R_f \left( \frac{10K}{R_2} + \frac{V_{in}}{R_1} \right). \quad 2.11$$

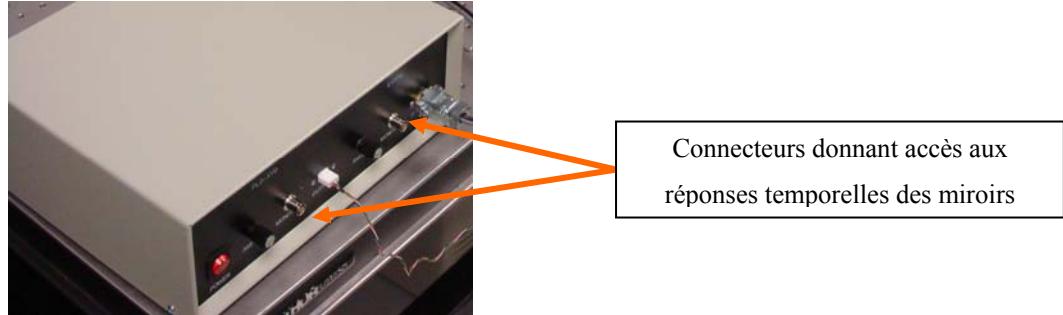
Le gain absolu sur chaque canal est donc  $G = \frac{R_f}{R_1}$ . Comme pour l'amplification transimpédance, ce gain est croissant sur les canaux avec la distance de séparation source-détecteur. Pour des raisons pratiques, il est préconisé de choisir  $R_2 = R_f$ . Cela permet d'avoir une tension d'ajustement du décalage qui ne dépasse pas la plage de 10V disponible entre +5V et -5V.

Le matériel chargé d'implémenter ce circuit est un amplificateur commercial de haute précision à bas bruit (OPA227, Texas Instruments).

### **2.3.4 Alimentation de la diode laser et Conversion des sorties de miroirs en signaux d'horloge**

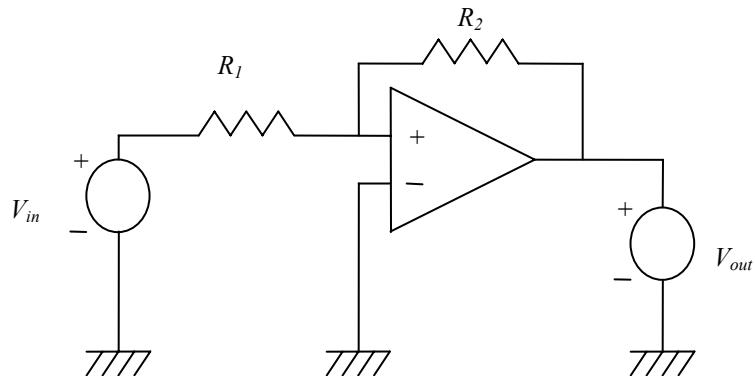
La diode laser utilisée est alimentée par un circuit commercial dédié (iC-HK, iC Haus) qui reçoit de la carte PCI-6143 l'autorisation de fournir du courant à la diode au travers d'un signal TTL. Grâce à une résistance variable, il est possible à l'utilisateur de régler la puissance optique délivrée par la diode. Ce circuit permet d'alimenter la diode en mode continu mais aussi en mode pulsé jusqu'à une fréquence de 155 MHz.

Les miroirs sont contrôlés par une unité de commande fournie par le fabricant (Fig. 2.15) qui délivre les signaux électriques associés aux positions angulaires des deux miroirs. Ces signaux sont utilisés pour synchroniser l'acquisition d'image. Comme il a été mentionné dans la section sur l'instrument virtuel, ces signaux doivent être convertis en horloges numériques.



**Figure 2.15 :** Console de contrôle des miroirs.

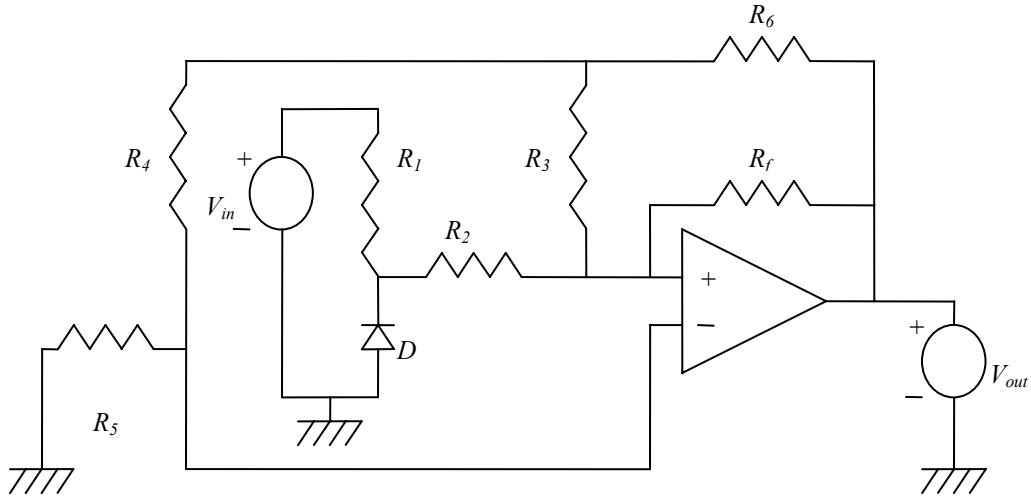
Pour convertir la réponse du miroir résonant à 1,5 kHz, il faut la comparer à la tension de seuil 0V. Cette opération de comparaison est assurée par un amplificateur opérationnel monté en comparateur à hystérésis (Fig. 2.16). Dès que la tension d'entrée du comparateur dépasse le seuil positif au-dessus de 0V (de l'ordre de quelques dizaines de mV), la sortie du montage sature à la valeur d'alimentation positive du comparateur (+5V). Lorsqu'elle passe en dessous du seuil négatif (aussi de quelques dizaines de mV négatifs), la sortie sature alors à la valeur d'alimentation négative (-5V).



**Figure 2.16 :** Schéma électrique du montage comparateur à hystérésis.

La réponse en rampe du miroir à galvanomètre à 15 Hz est convertie en signal carré TTL. On utilise là-aussi un amplificateur monté en comparateur à hystérésis auquel on rajoute un

étage redresseur de tension (Fig. 2.17). Ce redressement de la tension négative est effectué par une simple diode.



**Figure 2.17 :** Schéma électrique du montage comparateur redresseur.

Pour que ce circuit agisse correctement, il faudra choisir les valeurs de résistance comme il suit :  $R_1 = R_2$ ,  $R_3 = R_4$ ,  $R_5 = R_6$  et pour la résistance  $R_f$  de rétroaction sur l'entrée positive, il est conseillé de choisir une valeur élevée ( $>10\text{ M}\Omega$ ).

Les deux circuits sont implémentés par des comparateurs à hystérésis intégré (LM311, Texas Instruments) auquel on rajoute les composants nécessaires pour respecter la fonction recherchée.

Ce chapitre a décrit chacun des aspects théoriques et matériels de l'imageur avec toutes les étapes franchies lors de son développement. Afin de mieux appréhender les phénomènes physiques sur lesquels il repose, le lecteur trouvera dans le chapitre suivant les éléments nécessaires à la compréhension de la théorie de la propagation de la lumière dans les tissus biologiques.

# CHAPITRE 3

## THÉORIE DE PROPAGATION DE LA LUMIÈRE

Dans ce chapitre, les interactions de la lumière dans les tissus seront étudiées. Dans le cas de l'imagerie optique, on considère une sonde particulière, le photon, qui est envoyée vers le milieu que l'on veut étudier. Cette sonde réagit avec le milieu en fonction de ses propriétés locales relatives à l'emplacement de l'interaction. Selon la situation, cette interaction produit un phénomène détectable qui peut être de l'absorption, de la diffusion ou encore de la fluorescence.

Ce chapitre décrit la physique de la TOL ainsi que la théorie mathématique qui lui est associée pour reconstruire des images pouvant dispenser des informations fonctionnelles sur les tissus imaginés.

### **3.1 La propagation de la lumière**

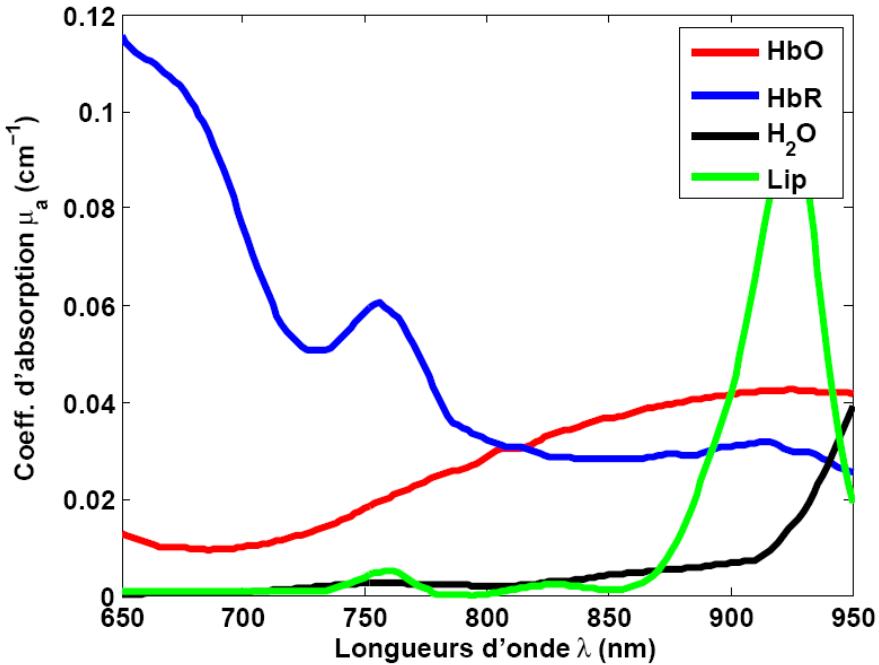
#### **3.1.1 Principes généraux**

Keilin 1925 et Millikan 1937 ont été les premiers à avoir mis en évidence que des variations des concentrations d'hémoglobines dues aux changements hémodynamiques entraînent des variations de la lumière réfléchie. Ces travaux posaient la première pierre de l'Imagerie Optique qui permet de mesurer les changements de concentrations d'hémoglobines dans les tissus grâce aux variations d'absorption de la lumière.

La TOL utilise la propagation de la lumière proche infrarouge dans les tissus dans le but de les imager. Les photons provenant d'une diode laser ou d'une autre source lumineuse, sont injectés dans les tissus à l'aide d'un système optique ad-hoc. Certains d'entre eux sont absorbés par le milieu alors que d'autres voient leur direction de propagation modifiée par

diffusion. Les photons qui n'ont pas été absorbés mais diffusés plusieurs fois peuvent être récupérés par un détecteur. Il est alors possible d'obtenir à partir de la lumière recueillie des informations sur la composition et la dynamique des tissus dans lesquels cette dernière s'est propagée entre la source et les détecteurs. Le terme tomographie qui signifie « représentation en coupes » implique l'utilisation de plusieurs détecteurs plus ou moins éloignés de la position de source qui permettent ainsi d'inférer des informations sur différentes parties du volume imagé.

### 3.1.2 Principaux chromophores



**Figure 3.1 :** Spectre d'absorption de l'hémoglobine oxygénée (HbO) et désoxygénée (HbR), de l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) et des lipides (Lip). Tirées de Takatani et Graham (1987).

Lorsque des longueurs d'onde proche infrarouge sont utilisées, les principaux chromophores, i.e. molécules absorbantes, des tissus biologiques sont les molécules

d'hémoglobines, l'eau et les lipides. Une illustration du spectre d'absorption de ces composants est disponible sur la figure 3.1. Entre 600 nm et 1000 nm, l'intensité de ce spectre d'absorption est assez faible. Cela détermine donc une plage de longueurs d'onde à utiliser pour l'imagerie optique. Cette plage spécifique est appelée fenêtre thérapeutique. En dehors de cette fenêtre, l'absorption des chromophores augmente fortement. Au dessous de 600 nm, l'absorption très forte de l'hémoglobine entrave la propagation de la lumière alors qu'au dessus de 1000 nm c'est celle des molécules d'eau. Pour une longueur d'onde donnée, le coefficient d'absorption de l'hémoglobine oxygénée ( $\text{HbO}$ ) diffère de celui de l'hémoglobine désoxygénée ( $\text{HbR}$ ). Également, l'absorption de la lumière proche infrarouge est dominée par l'hémoglobine plutôt que par l'eau ou les lipides. Il est ainsi possible de distinguer les variations temporelles de concentrations de  $\text{HbO}$  et  $\text{HbR}$  en mesurant l'intensité de la lumière recueillie à deux longueurs différentes dans cette fenêtre. Cette technique est appelée la Spectroscopie Proche Infrarouge. On trouvera essentiellement dans la littérature le terme anglophone NIRS (Near Infra Red Spectroscopy). Vu que les autres composants ont une faible absorption dans cette plage de longueurs d'onde, les variations de concentration peuvent être évaluées avec une précision satisfaisante.

### 3.1.3 Diffusion lumineuse

L'intensité lumineuse varie selon la loi de Beer-Lambert. Cette loi est une expression empirique qui exprime la variation de l'intensité du signal lumineux lors de sa propagation dans un milieu absorbant ou amplificateur. Elle est donnée par la relation suivante :

$$I = I_0 e^{(-\mu L)} \quad 3.1$$

où  $\mu$  est le coefficient d'absorption du milieu.  $I_0$  est l'intensité lumineuse incidente,  $I$  est l'intensité de la lumière détectée après passage dans le milieu et  $L$  est le trajet emprunté par la lumière qui correspond à la distance de séparation entre la source et le détecteur. Cette expression peut être modifiée pour l'adapter à l'absorption optique pour des milieux fortement diffusants. On l'appelle alors Loi de Beer-Lambert Modifiée (LBLM) que l'on exprime de la façon suivante :

$$I = I_0 e^{-(\mu LB + A)} \quad 3.2$$

où  $B$  est un facteur correctif qui exprime le fait que la longueur réelle du trajet de la lumière est plus importante que la trajectoire en ligne droite entre source et détecteur étant donnée la haute diffusion du milieu. On le nomme facteur différentiel de chemin optique. Enfin, le terme  $A$  est un facteur de géométrie de mesure.

Le coefficient d'absorption  $\mu_a$  d'un chromophore étant dépendant de la concentration de ce dernier, il peut donc s'exprimer ainsi :

$$\mu_a^i = \varepsilon_i C_i \quad 3.3$$

où le paramètre  $\varepsilon_i$  représente le coefficient d'extinction du chromophore  $i$ , i.e. la quantité de lumière pouvant être absorbée par chaque mole de chromophore.  $C_i$  est la concentration de ce même chromophore dans le milieu de propagation.

On définit alors la densité optique qui caractérise la variation d'intensité lumineuse :

$$\Delta OD = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = \sum_i \varepsilon_i \Delta C_i LB + A \quad 3.4$$

où  $\Delta OD$  est la variation de la densité optique et  $\Delta C_i$  est la variation de concentration du chromophore  $i$ .

Vu que la géométrie des tissus ne varie pas en fonction du temps, le terme  $A$  de l'équation (3.4) peut être négligé. On ne considère que les variations temporelles lentes des concentrations des chromophores. On peut ainsi réécrire l'équation (3.4) :

$$\Delta OD = -\ln\left(\frac{I_{\text{det}}}{I_O}\right) = \sum_i \varepsilon_i \Delta C_i LB \quad 3.5$$

où  $I_{\text{det}}$  est l'intensité lumineuse détectée. On peut aussi relier directement la densité optique à l'absorption en divisant (3.5) par le facteur  $LB$ . Par conséquent d'après la LBLM, la variation du coefficient d'absorption d'un milieu est donnée par :

$$\Delta \mu_a = \sum_i \varepsilon_i \Delta C_i . \quad 3.6$$

Toutefois l'équation (3.6) n'est vraie que si les variations d'absorption sont uniformes tout au long du trajet de la lumière dans les tissus. Dans le cas des activations focales dans les tissus, i.e. lorsqu'une faible partie du volume subit une augmentation d'absorption, la variation d'intensité est en réalité plus faible que celle décrite par l'équation (3.5). On appelle ce phénomène l'effet de volume partiel. En imagerie optique, on cherche à évaluer  $\Delta \mu_a$  en mesurant  $\Delta OD$ . Dans ce cas, les variations d'absorption sont plus importantes que celles prédictes par l'équation (3.6). Il est donc nécessaire de développer des méthodes de reconstruction d'images qui permettent d'éviter ce phénomène.

La loi de Beer-Lambert permet donc de relier l'intensité lumineuse aux changements d'absorption des tissus imagés. Néanmoins, pour comprendre comment la lumière se propage dans ces derniers, il faut s'intéresser plus en détail au phénomène de la diffusion qui n'est pas simple à quantifier. Avant tout, il faut savoir qu'il existe plusieurs régimes de diffusion qui sont caractérisés par le rapport entre la taille de la particule diffusante et la longueur d'onde utilisée. En effet, si la particule diffusante possède un diamètre inférieur

au dixième de la longueur d'onde incidente, on est alors dans le régime de diffusion de Rayleigh. L'intensité lumineuse mesurée dans un angle  $\theta$  vis-à-vis de la direction d'incidence s'exprime ainsi :

$$I = 8\pi^4 I_0 N \alpha^2 \frac{1 + \cos(\theta)}{\lambda^4 R^2} \quad 3.7$$

où  $\alpha$  est la polarisabilité de la particule diffusante,  $R$  sa taille et  $N$  est le nombre de particules.

Lorsque la taille de la particule est supérieure au dixième de la longueur d'onde, le régime de diffusion qui s'applique est celui de la théorie de Mie. Cette dernière, plus complexe que celle de Rayleigh, utilise des solutions aux équations de Maxwell en coordonnées sphériques obtenues par développement en séries infinies, i.e. des sommes infinies d'harmoniques sphériques. Chaque terme de ces séries sphériques est proportionnel à un polynôme de Legendre en cosinus ainsi qu'à sa dérivée. Ces polynômes sont multipliés par des termes qui dépendent des fonctions de Bessel sphériques elles-mêmes fonctions d'un paramètre de taille.

Il existe d'autres régimes de diffusion qui ne seront pas abordés car ils ne s'appliquent pas dans le cadre de ce travail de maîtrise. En imagerie optique, les longueurs d'onde vont de 650 nm à 850 nm alors qu'une molécule d'hémoglobine mesure environ 7 nm. Par conséquent, le rapport taille – longueur d'onde incidente étant de 1 centième, le régime de diffusion applicable devrait être celui de Rayleigh. Cependant, la lumière rencontre de multiples diffusions au sein des tissus. De ce fait, la mise en place d'une théorie mieux adaptée aux milieux hautement diffusants est de rigueur. Elle est basée sur le transport radiatif des photons. La section suivante traite de cette théorie avec la modélisation mathématique et la mise en équation du problème. Le lecteur désireux d'approfondir le sujet est invité à consulter la littérature (Boas 1996, Arridge 1999, Kim et Schotland 2006)

ainsi que des ouvrages académiques comme Wang et Wu 2007 où les calculs sont repris en détails.

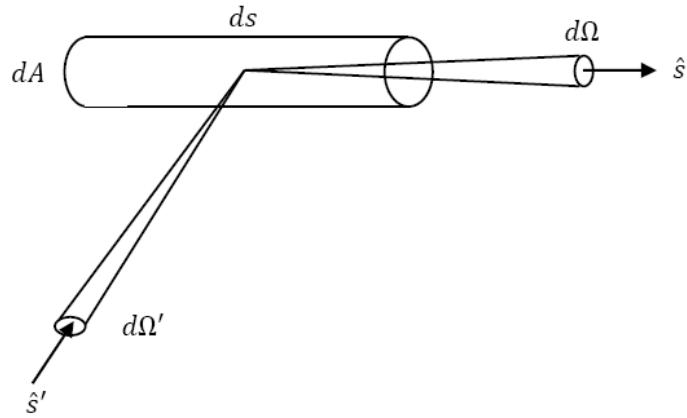
## 3.2 Modélisation mathématique et problème direct

En imagerie optique, le problème direct consiste à acquérir des mesures de l'intensité lumineuse sur les tissus à analyser en connaissant la source lumineuse et en supposant les valeurs des coefficients d'absorption et de dispersion dans le milieu. La génération de ces mesures est décrite par le transport de photons dans les tissus et par la théorie de la diffusion.

La lumière ne suit pas un trajet rectiligne entre la source et le détecteur car elle rencontre sur son chemin plusieurs particules diffusantes. Ces nombreuses diffusions empêchent l'utilisation de l'optique géométrique ainsi que celle des équations de Maxwell car trop coûteuses en termes de temps de calcul. Face à ce problème, l'approche radiative est une solution satisfaisante car, moins coûteuse en temps de calcul comparée aux précédentes, elle fournit un modèle efficace. La lumière est considérée comme un ensemble de particules se propageant dans les tissus. L'équation de Boltzmann ou équation de transfert radiatif est alors utilisée pour décrire le transport radiatif des photons dans un milieu diffusant.

### 3.2.1 Équation de transfert radiatif

L'établissement de l'équation de transfert radiatif (RTE dans la littérature anglophone) se fait en appliquant le principe de conservation de l'énergie à un élément cylindrique de volume stationnaire, Fig. 3.2.



**Figure 3.2 :** Élément cylindrique de volume stationnaire. Ici,  $ds$  est l'élément de longueur du cylindre le long de la direction de propagation  $\hat{s}$ ;  $dA$  est l'élément d'aire du cylindre perpendiculaire à  $\hat{s}$ .  $d\Omega$  et  $d\Omega'$  sont les éléments d'angle solide autour des directions  $\hat{s}$  et  $\hat{s}'$  respectivement.

La quantité physique considérée dans cette section est la quantité de photons par unité de surface voyageant dans la direction  $\hat{s}$  à la position  $r$  et à la date  $t$ ,  $\varphi(r, \hat{s}, t)$  exprimée en  $\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$ . On la nomme radiance ou encore rayonnement lumineux. Par conséquent, on peut parler de conservation du rayonnement lumineux. On notera que les propriétés optiques du milieu sont indépendantes du temps mais varient dans l'espace et que la cohérence, la polarisation ainsi que la non-linéarité sont négligées. Voici les différents termes de contribution au phénomène :

### Contribution 1 : Propagation

Le rayonnement émergent de l'élément de volume ou l'élément d'angle solide par unité de temps est donné par :

$$dP_{div} = \hat{s} \cdot \nabla \varphi(r, \hat{s}, t) d\Omega dV \quad 3.8$$

où  $dV = dA ds$ . Cette contribution est due à la propagation du faisceau sans interaction avec le milieu, ainsi elle peut aussi exister dans un milieu non diffusant. Ce terme représente le flux de photons dans la direction  $\hat{s}$ .

### Contribution 2 : Extinction

Le rayonnement lumineux perdu par unité de temps dans l'élément de volume selon l'élément d'angle solide par absorption ou dispersion est donné par :

$$dP_{ext} = (\mu_t ds) [\varphi(r, \hat{s}, t) dA d\Omega] \quad 3.9$$

où  $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ ,  $\mu_a$  est le coefficient d'absorption du milieu et  $\mu_s$  est le coefficient de dispersion du milieu. Par conséquent, le terme  $\mu_t ds$  représente la probabilité d'extinction d'un photon par absorption ou dispersion sur la longueur  $ds$ . Autrement dit, il quantifie les phénomènes d'absorption et de diffusion des photons dans l'élément de volume. Comme  $dV = dA ds$ , on peut réécrire 3.9 :

$$dP_{ext} = \mu_t \varphi(r, \hat{s}, t) dV d\Omega. \quad 3.10$$

### Contribution 3 : Dispersion

Le rayonnement incident sur l'élément de volume depuis toutes les directions  $\hat{s}'$  et dispersé dans l'élément d'angle solide  $d\Omega$  autour de la direction  $\hat{s}$  par unité de temps est donné par :

$$dP_{dif} = (N_s dV) \left[ \int_{4\pi} \Theta(\hat{s}', \hat{s}) \varphi(r, \hat{s}', t) \sigma_s d\Omega' \right] d\Omega. \quad 3.11$$

Ici  $N_s$  représente la densité de particules diffusantes et  $\sigma_s$  représente la section d'une de ces particules. Ainsi, le terme  $N_s dV$  donne le nombre de particules diffusantes présentes dans l'élément de volume,  $\varphi(r, \hat{s}', t) \sigma_s d\Omega'$  correspond au rayonnement lumineux intercepté par une seule particule diffusante au sein de l'élément d'angle solide  $d\Omega'$  par unité de temps. Enfin,  $\Theta(\hat{s}' \cdot \hat{s})$  est la fonction de phase normalisée correspondant à la probabilité de dispersion des photons dans la direction  $\hat{s}$  à partir de la direction  $\hat{s}'$ . Par définition :

$$\Theta(\hat{s}' \cdot \hat{s}) \equiv \Theta(\hat{s}' \cdot \hat{s}). \quad 3.12$$

Comme  $\mu_s = N_s \sigma_s$  et avec Eq. (3.12), Eq. (3.11) peut être réécrite ainsi :

$$dP_{dif} = (\mu_s dV) \left[ \int_{4\pi} \Theta(\hat{s}' \cdot \hat{s}) \varphi(r, \hat{s}', t) d\Omega' \right] d\Omega. \quad 3.13$$

Ce terme relié aux événements photoniques dispersifs est appelé *terme de collisions*.

#### Contribution 4 : Source

Le rayonnement lumineux produit par la source dans l'élément de volume au sein de l'élément d'angle solide  $d\Omega$  par unité de temps est donné par :

$$dP_{src} = q(r, \hat{s}, t) dV d\Omega \quad 3.14$$

où  $q(r, \hat{s}, t)$  représente la quantité de photons par unité de volume par unité d'angle solide et s'exprime en  $\text{W.m}^{-3}.\text{sr}^{-1}$ .

### Principe de Conservation de l'Énergie

Le changement de rayonnement lumineux dans l'élément de volume au sein de l'élément d'angle solide  $d\Omega$  par unité de temps est donné par :

$$dP = \frac{1}{c} \frac{\partial \varphi(r, \hat{s}, t)}{\partial t} dV d\Omega \quad 3.15$$

où  $\varphi/c$  représente les photons propagés par unité de volume par unité d'angle solide. En dérivant par rapport au temps, on obtient donc le taux de variation temporel de la quantité de photons propagés. Lorsque la source de lumière est continue, elle est invariante dans le temps, ce terme est donc nul.

Le principe de conservation de l'énergie s'écrit alors :

$$dP = -dP_{div} - dP_{ext} + dP_{dif} + dP_{src}. \quad 3.16$$

En injectant Eq. (3.8), Eq. (3.10), Eq. (3.13), Eq. (3.14) et Eq. (3.15) dans Eq. (3.16), on obtient :

$$\begin{aligned} \frac{1}{c} \frac{\partial \varphi(r, \hat{s}, t)}{\partial t} dV d\Omega &= -\hat{s} \cdot \nabla \varphi(r, \hat{s}, t) d\Omega dV - \mu_t \varphi(r, \hat{s}, t) dV d\Omega \\ &+ (\mu_s dV) \left[ \int_{4\pi} \Theta(\hat{s}' \cdot \hat{s}) \varphi(r, \hat{s}', t) d\Omega' \right] d\Omega + q(r, \hat{s}, t) dV d\Omega \end{aligned} \quad 3.17$$

Il est possible de diviser par  $dV d\Omega$  et de mettre en facteur  $\varphi(r, \hat{s}, t)$

$$\left( \frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} + \hat{s} \cdot \nabla + \mu_t \right) \varphi(r, \hat{s}, t) = \mu_s \int_{4\pi} \Theta(\hat{s}' \cdot \hat{s}) \varphi(r, \hat{s}', t) d\Omega' + q(r, \hat{s}, t). \quad 3.18$$

Enfin, au lieu de considérer le terme de collisions selon l'angle solide, on peut le considérer selon la sphère unité  $S^2$ , l'équation 3.18 devient alors :

$$\left( \frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} + \hat{s} \cdot \nabla + \mu_t \right) \varphi(r, \hat{s}, t) = \mu_s \int_{S^2} \Theta(\hat{s}' \cdot \hat{s}) \varphi(r, \hat{s}', t) d\hat{s}' + q(r, \hat{s}, t). \quad 3.19$$

L'équation 3.19 est l'Équation de Transfert Radiatif ou Équation de Boltzmann dans le domaine temporel. La principale difficulté vient du terme de collisions à composante intégrale qui est d'une nature mathématique complexe. De par sa nature intégro-différentielle, il est difficile d'obtenir des solutions analytiques à l'équation de Boltzmann. Il faut donc implémenter des méthodes numériques pour la résoudre. Afin de retrouver le profil de propagation de la lumière, ce travail de maîtrise a eu recours à une simulation Monte-Carlo qui sera traitée dans la section suivante.

Vu que la TOL utilise une source de lumière laser continue, il faut considérer le cas stationnaire de l'équation de Boltzmann qui se réécrit ainsi :

$$\hat{s} \cdot \nabla \varphi + \mu_a \varphi + \mu_s \varphi = \mu_s \int_{S^2} \Theta \varphi d\hat{s}' + q. \quad 3.20$$

L'opérateur de dispersion  $L$  est défini par :

$$L\varphi = \mu_s \varphi - \mu_s \int_{S^2} \Theta \varphi d\hat{s}'. \quad 3.21$$

On obtient alors :

$$\hat{s} \cdot \nabla \varphi + \mu_a \varphi + L\varphi = q. \quad 3.22$$

D'après le théorème de Green, cette équation possède une solution unique sur le domaine  $D$  qui se définit ainsi :

$$\varphi(r, \hat{s}) = (G * q)(r, \hat{s}). \quad 3.23$$

Soit :

$$\varphi(r, \hat{s}) = \int_D \int_{S^2} G(r, \hat{s}; r', \hat{s}') q(r', \hat{s}') d^2 \hat{s}' d^3 r', \quad 3.24$$

avec le domaine  $D$ , volume défini selon la surface  $\partial D$  tel que :

$$\varphi(r, \hat{s}) = 0 \quad r \in \partial D \quad 3.25$$

et  $\varphi = G$  solution de l'équation 3.22 dans le cas où  $q(r, \hat{s}) = \delta(r - r', \hat{s} - \hat{s}')$ .

En tenant compte des considérations précédentes, il devient alors possible d'implémenter la solution de l'équation de transfert radiatif par la méthode de Monte-Carlo qui fournira la fonction de Green.

### 3.2.2 Modèle Monte-Carlo pour le transport des photons dans les tissus biologiques

Le transport des photons dans les tissus biologiques peut être simulé numériquement grâce à la méthode Monte-Carlo. La trajectoire d'un photon est modélisée comme une marche aléatoire dont la direction de chaque déplacement dépend du déplacement précédent. Par contre, les directions de tous les déplacements de photons dans une marche aléatoire simple sont indépendantes entre elles. En générant un nombre de photons suffisamment élevé, il

est possible d'estimer des quantités physiques optiques telles que la réflectance ou la transmittance diffuse. Cette section décrit qualitativement la méthode Monte-Carlo, le lecteur trouvera en annexe les bases de la théorie des probabilités sur lesquelles repose cette méthode.

Un ensemble de photons est modélisé dans le but de respecter les caractéristiques principales du transport de photon. Des règles sont établies pour que la propagation des photons obéisse à la loi de probabilité qui régit les angles de dispersion ou la taille des déplacements de photons. La nature statistique du problème requiert de tracer un grand nombre de photons ce qui peut engendrer des coûts de calcul importants. Cependant, plusieurs quantités physiques peuvent être estimées simultanément telles que l'absorption du milieu, la fluence ou encore la réflexion diffuse.

Le problème à résoudre commence avec un faisceau incident de diamètre infiniment petit perpendiculaire à un milieu diffusant à plusieurs couches ; différentes quantités physiques sont ainsi calculées. Ce point source peut être représenté comme une impulsion de Dirac dépendante de la position spatiale, de la direction et du temps ; ainsi les quantités physiques obtenues sont des réponses d'impulsions qui sont donc les *fonctions de Green* évoquées à la fin de la section précédente. Chacune des couches est définie par son épaisseur  $d$ , son indice de réfraction  $n$ , son coefficient d'absorption  $\mu_a$ , son coefficient de dispersion  $\mu_s$  et son anisotropie de dispersion  $g$ .

Le système est défini dans un repère cartésien  $(x, y, z)$  pour tracer les photons. Le plan  $xy$  correspond à la surface d'incidence alors que l'axe  $z$  se trouve le long du faisceau.

Les quantités physiques calculées sont l'absorption spécifique relative, la réflectance diffuse relative et la transmittance diffuse relative qui sont donc toutes relatives à l'énergie incidente. L'absorption spécifique relative  $A(r, z)$  représente la probabilité d'absorption de photon par le milieu par unité de volume. De cette quantité peut alors être calculée la fluence  $\Phi(r, z)$  qui correspond donc à la probabilité de la quantité de photons par unité de surface. La réflectance diffuse relative  $R(r, \Omega)$  et la transmittance diffuse relative  $T(r, \Omega)$ , qui forment un ensemble appelé la réflexion diffuse relative, sont définies par la probabilité

de réémission des photons par unité de surface à la position  $r$  par unité d'angle solide  $\Omega$  dont l'unité est le stéradian (sr).

Il existe plusieurs techniques d'implémentation de la méthode Monte-Carlo. Dans le cadre de ce travail, c'est l'implémentation tMCimg qui a été utilisée. C'est un module de simulation Monte-Carlo de la propagation des photons dans un milieu 3D avec des propriétés hétérogènes. Il a été développé par D. A. Boas, J. J. Stott et A. Barnett au NMR Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School. Voici une brève présentation de cette implémentation de la méthode Monte-Carlo.

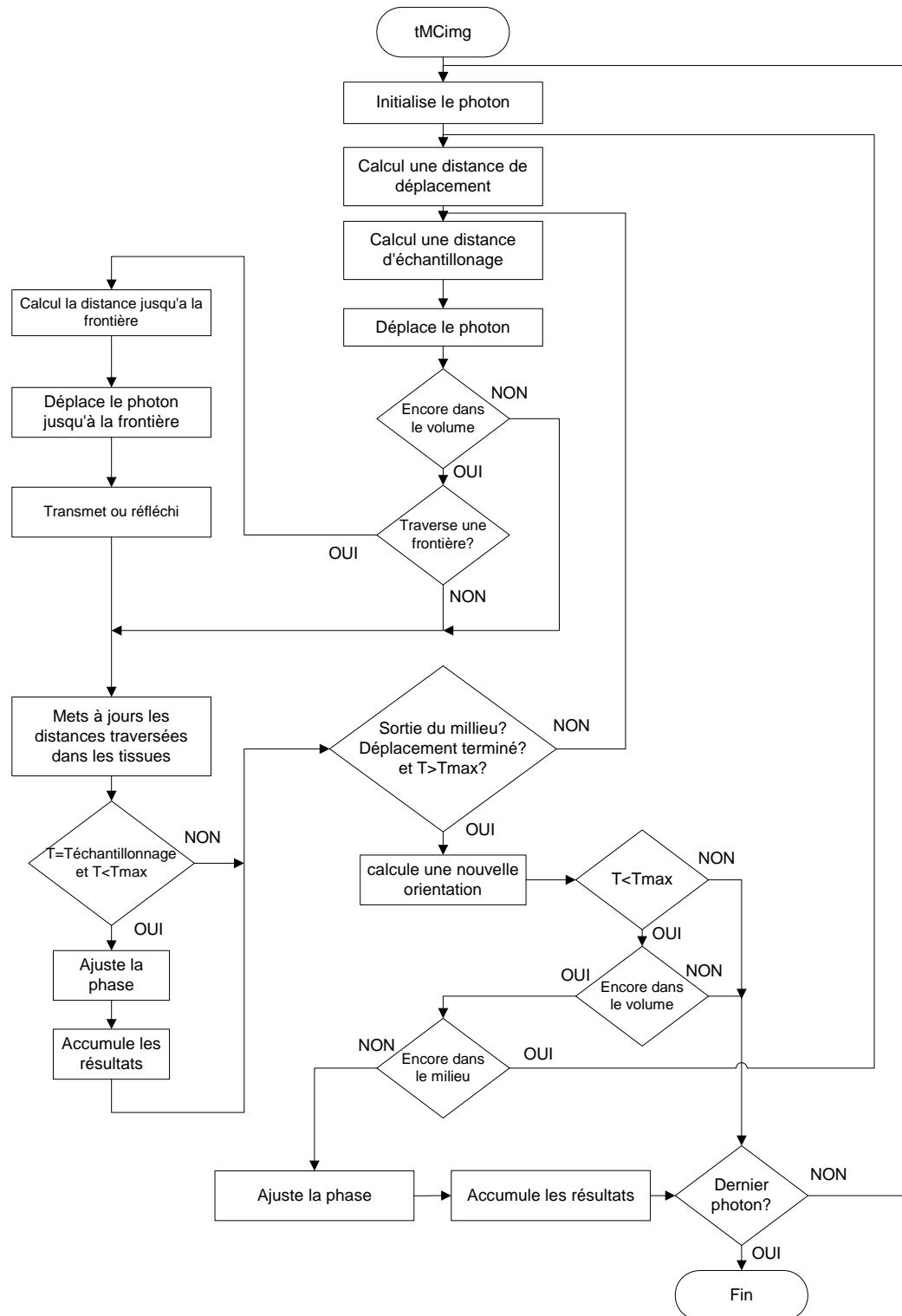
tMCimg est une implémentation qui introduit l'aspect temporel. Elle permet de calculer la densité de photons dans le volume en fonction du temps et de spécifier des détecteurs à la surface du milieu en captant la distribution du temps de sortie des photons. L'avantage de cette méthode comparée à d'autres est la gestion d'hétérogénéités. tMCimg permet de spécifier un volume hétérogène discréte en plusieurs voxels, avec des propriétés optiques différentes pour chacun des voxels. Au lieu de calculer le nombre de photons absorbés, tMCimg calcule directement la fluence. Ceci permet de simuler un milieu très peu absorbant ou non absorbant et d'obtenir un calcul de fluence valide, ce qui n'est pas le cas pour les approches qui calculent l'absorption des photons.

Le trajet des photons est échantillonné avec une résolution au moins égale à la résolution du voxel ou une résolution définie par un intervalle de temps.

La distance parcourue dans chacun des types de tissu est enregistrée. Cette information est utilisée pour recalculer le poids résiduel des photons à chaque temps d'échantillonnage.

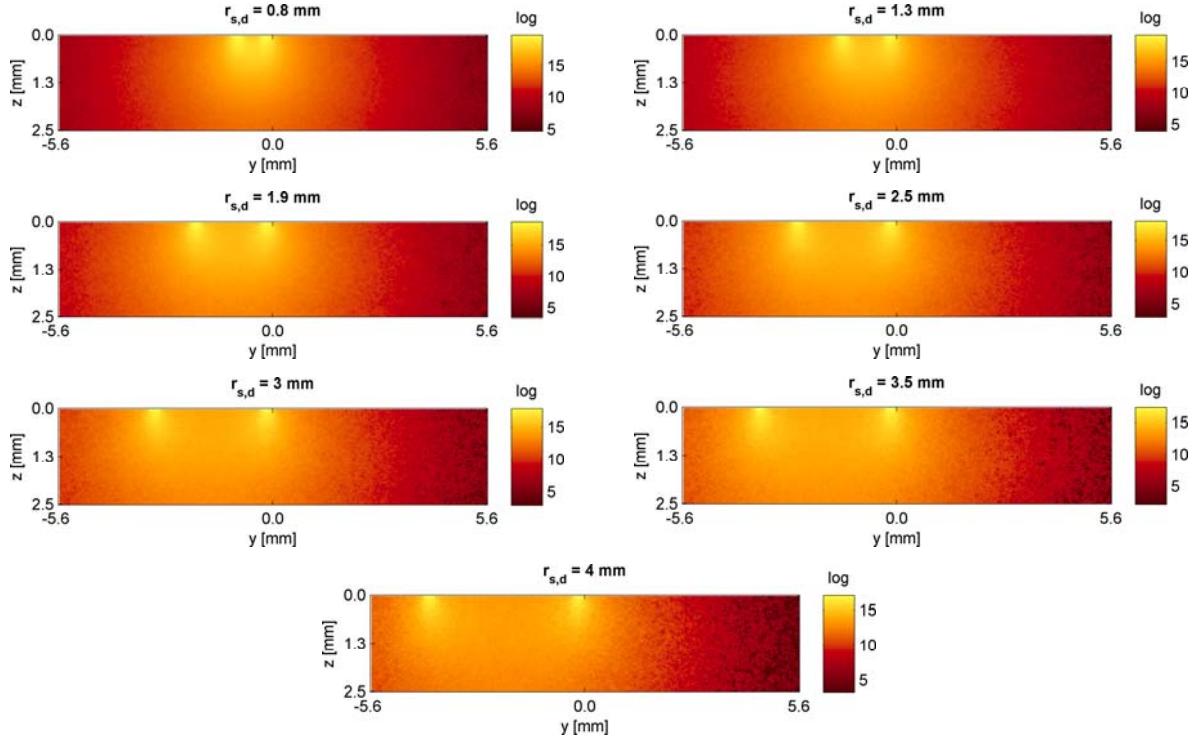
La réflexion est gérée, mais pour des voxels cubiques, donc seulement avec des normales orthogonales au plan référentiel.

La méthode utilisée par tMCimg est résumée dans le schéma de la figure 3.3.



**Figure 3.3 :** Schéma de la technique utilisée par tMCimg.

On obtient avec cette implémentation les profils de sensibilité simulés des photons dans le milieu pour chaque paire source-détecteur choisies, Fig. 3.4.



**Figure 3.4 :** Profils de sensibilité obtenus pour chaque détecteur.

### 3.3 Définition du problème inverse

#### 3.3.1 Description générale du problème

La section précédente a défini le problème direct qui consiste à trouver le rayonnement lumineux dans les tissus biologiques en connaissant leurs propriétés d'absorption et de dispersion ainsi que le trajet des photons dans le milieu analysé. Cela suppose donc que les positions des chromophores que nous souhaitons imager, HbO et HbR sont connues. En effet, ce sont principalement ces deux chromophores qui présentent de l'intérêt en imagerie

optique. Lors de l'activité neuronale, la réponse hémodynamique provoque des variations d'absorption lumineuse dans les tissus neuronaux. C'est en mesurant les variations d'intensité lumineuse induites par ces perturbations que l'imagerie optique permet de localiser l'activité neuronale.

Afin de reconstruire des cartes d'activation, on cherche donc à exprimer les changements d'absorption au sein des tissus en fonction des variations de rayonnement mesurées. C'est ce qui est appelé le problème inverse. Pour réaliser cela, il est nécessaire de linéariser l'équation de transfert radiatif par rapport aux variations d'absorption. Le milieu de propagation peut ensuite être discrétisé ce qui permet de poser le problème sous forme de système linéaire matriciel qui peut être inversé afin de retrouver les variations d'absorption. Les sections suivantes décrivent ces étapes de linéarisation et de discrétisation qui mènent au problème inverse.

### **3.3.2 Approximation de Born et linéarisation du problème lors de faibles changements d'absorption**

Afin de linéariser le problème, on utilise une approche dite « perturbative » car elle fait l'hypothèse d'un milieu de propagation homogène qui subit des perturbations d'absorption dans l'espace non-homogènes. On décrit ici le cas d'un milieu homogène mais il peut tout à fait être généralisé. L'approche utilisée est l'approximation de Born du premier ordre qui consiste à faire subir une perturbation au coefficient d'absorption définie comme tel :

$$\mu_a(r) = \mu_{a0} + \Delta\mu_a(r) \quad 3.26$$

où  $\mu_{a0}$  est le coefficient d'absorption homogène et  $\Delta\mu_a(r)$  est la variation locale de l'absorption suivant la position  $r$ . De même, on peut écrire la radiance ainsi :

$$\varphi(r, \hat{s}) = \varphi_0(r, \hat{s}) + \Delta\varphi(r, \hat{s}). \quad 3.27$$

En injectant l'équation (3.26) dans l'équation 3.22, nous obtenons :

$$\hat{s} \cdot \nabla \varphi + \mu_{a0}\varphi + L\varphi = q - \Delta\mu_a\varphi. \quad 3.28$$

Par principe de linéarité, une solution à cette équation est:

$$\varphi(r, \hat{s}) = \varphi_i(r, \hat{s}) + \varphi_s(r, \hat{s}). \quad 3.29$$

Avec le théorème de Green qui nous fournit :

$$\varphi_i(r, \hat{s}) = \int_D \int_{S^2} G_0(r, \hat{s}; r', \hat{s}') q(r', \hat{s}') d^2 \hat{s}' d^3 r' \quad 3.30$$

$$\varphi_s(r, \hat{s}) = - \int_D \int_{S^2} G_0(r, \hat{s}; r', \hat{s}') \Delta\mu_a(r') \varphi(r', \hat{s}') d^2 \hat{s}' d^3 r' \quad 3.31$$

où  $G_0(r, \hat{s}; r', \hat{s}')$  est la fonction de Green correspondant à un milieu homogène dont le coefficient d'absorption est  $\mu_{a0}$ .

L'approximation de Born du premier ordre fait l'hypothèse que pour tout  $r$ ,  $\Delta\mu_a(r) \ll \mu_{a0}$ , ce qui implique  $\Delta\varphi(r, \hat{s}) \ll \varphi_0(r, \hat{s})$ . Par conséquent, on peut réécrire 3.31 ainsi :

$$\varphi_s(r, \hat{s}) = - \int_D \int_{S^2} G_0(r, \hat{s}; r', \hat{s}') \Delta\mu_a(r') \varphi_0(r', \hat{s}') d^2 \hat{s}' d^3 r'. \quad 3.32$$

On peut ainsi obtenir une équation à intégrale de la fonction de Green  $G$  solution de  $\varphi(r, \hat{s})$ , en utilisant  $q(r, \hat{s}) = \delta(r - r', \hat{s} - \hat{s}')$  :

$$G(r, \hat{s}; r', \hat{s}') = G_0(r, \hat{s}; r', \hat{s}') - \int_{DS^2} \int G_0(r, \hat{s}; r'', \hat{s}'') \Delta\mu_a(r'') G_0(r'', s''; r', \hat{s}') d^2\hat{s}'' d^3r'' \quad 3.33$$

En considérant la position d'une source et d'un détecteur et en négligeant la dépendance directionnelle, on obtient pour chaque paire source-détecteur :

$$G(r_s, r_d) = G_0(r_s, r_d) - \int_D G_0(r_s, r) \Delta\mu_a(r) G_0(r, r_d) d^3r. \quad 3.34$$

Le milieu de propagation peut ensuite être discréteisé en voxels, il devient alors possible d'écrire l'équation 3.33 sous la forme d'un système matriciel :

$$y = Ax \quad 3.35$$

où  $A$  est la matrice de sensibilité. Elle est formée des profils de sensibilité de chacune des paires source-détecteur (simulation Monte-Carlo),  $x$  correspond aux variations d'absorption et enfin  $y$  correspond aux variations d'intensité lumineuse, i.e. les mesures acquises pour chaque paire source-détecteur.

### 3.3.3 Description numérique à travers un problème linéaire et inversion

On considère l'équation 3.34 pour définir la variation d'intensité lumineuse pour chaque paire source-détecteur :

$$\Delta M(r_s, r_d) = G(r_s, r_d) - G_0(r_s, r_d) = - \int_D G_0(r_s, r) G_0(r, r_d) \Delta\mu_a(r) d^3r. \quad 3.36$$

On discrétise le domaine d'intégration  $D$  en un nombre  $N$  de voxels. L'intégrale peut donc être numérisée et remplacée par une somme :

$$\Delta M^l(r_s, r_d) = -\sum_{i=1}^N G_0(r_s, r^{i,l})G_0(r^{i,l}, r_d)\Delta\mu_a^i \quad 3.37$$

où  $\Delta\mu_a^i$  est l'absorption du  $i^{\text{ème}}$  voxel et  $\Delta M^l(r_s, r_d)$  correspond à la  $l^{\text{ème}}$  mesure de la variation d'intensité lumineuse pour une paire source-détecteur.

On peut alors écrire l'équation (3.37) sous une forme matricielle linéaire et donc expliciter le problème direct :

$$y = Ax \Leftrightarrow \begin{cases} y \equiv \Delta M^l(r_s, r_d) & \forall l \in [1, N_l] \\ x \equiv \Delta\mu_a^i & \forall i \in [1, N_{\text{vox}}] \\ A \equiv -G_0(r_s, r^{i,l})G_0(r^{i,l}, r_d) & [1, N_{\text{vox}}] \times [1, N_l] \end{cases} \quad 3.38$$

avec  $N_l$  le nombre total de mesures,  $N_{\text{vox}}$  le nombre de voxels. Étant donnée la définition de ce système matriciel (i.e. le problème direct), la reconstruction d'images peut alors être effectuée à partir de la matrice  $A^{-1}$  obtenue en inversant la matrice  $A$  si et seulement si  $A$  est inversible.

Cependant la difficulté du problème inverse est qu'il est sous-déterminé dans la mesure où il y a beaucoup plus d'inconnues  $\Delta\mu_a^i$  pour chaque voxel que de mesures  $y$ . Il faut donc trouver une méthode d'inversion qui permette de reconstruire des images.

### 3.3.4 Régularisation

Il existe plusieurs méthodes d'inversion de problème mal posé. Une des plus connues et celle qui est utilisée ici pour faire l'inversion du problème direct est l'*inversion de Tikhonov régularisée*. On se contentera de donner la solution du problème inverse sans entrer dans

les détails mathématiques de cette méthode d'inversion. Le lecteur désireux d'approfondir le sujet est invité à consulter Vogel 2009 ou encore Konecky et al. 2008.

Cette méthode consiste à inverser la matrice  $A$  par l'ajout d'un paramètre de lissage (ou régularisation). L'estimation des changements dans le coefficient d'absorption  $x'$  est alors donnée par :

$$x' = (A^T A + \alpha I)^{-1} A^T y \quad \Leftrightarrow \quad \|y - Ax\|^2 + \|\alpha x\|^2 = 0 \quad 3.39$$

où  $I$  est la matrice identité pondérée par le paramètre de régularisation  $\alpha$  qui sert à minimiser l'erreur réalisée entre l'estimation des variations  $x'$  et les variations réelles  $x$ . Il peut être choisi comme étant la plus grande valeur propre de la matrice de covariance de  $A$  (Boas et al. 2004). Enfin  $A^T$  est la matrice transposée de  $A$ .

Dans le cadre de ce travail, le paramètre de régularisation  $\alpha$  a été choisi en observant le niveau de bruit de chacun de nos détecteurs de façon à l'introduire dans nos simulations des profils de sensibilité pour être en accord avec les mesures obtenues.

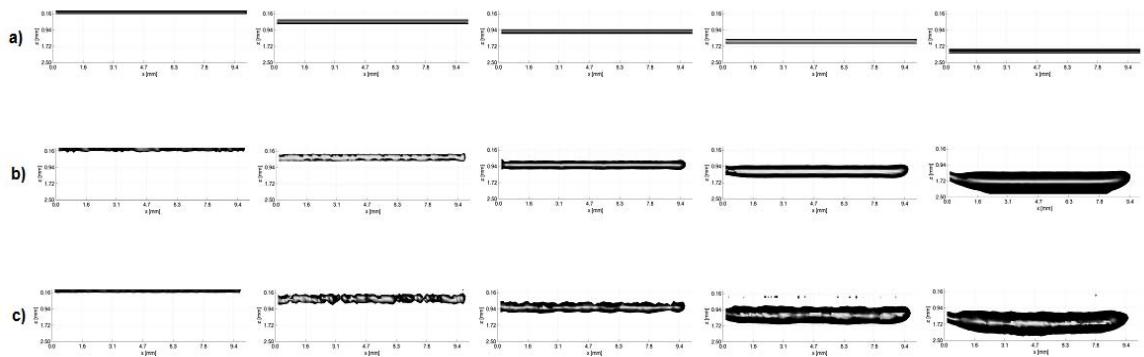
Le processus de régularisation étant coûteux en temps de calcul, il n'est pas possible d'utiliser les données brutes générées par l'instrument car elles sont constituées d'un nombre de mesures trop élevé,  $N_{\text{Pixelsx}} \times N_{\text{Pixelsy}} \times N_{\text{det}} = 80 \times 200 \times 7 = 112000$  mesures au total pour chaque image du volume analysé. Afin de réduire ce nombre, un ré-échantillonnage des données est effectué à l'aide d'une interpolation bi-cubique. Cela consiste à générer un pixel dont la valeur est la moyenne de celles d'un ensemble de pixels voisins. La simulation Monte-Carlo génère des voxels cubiques d'arête 156  $\mu\text{m}$ . Cette interpolation se fait donc dépendamment de la taille du voxel mais aussi du champ de vision choisi et donc du volume imagé. Pour un champ de vision de 2,5 mm  $\times$  7,5 mm comme nous avons dans le cas de la moelle du rat, le nombre de mesures est réduit à  $2,5 / 0,156 = 16$  pixels en x et  $7,5 / 0,156 = 48$  pixels en y pour chacune des 7 tranches, soit  $16 \times 48 \times 7 = 5376$  mesures. Ce ré-échantillonnage des données permet donc de diviser par

20 la quantité de données à traiter par l'*inversion de Tikhonov régularisée* et ramène le temps de calcul à quelques minutes au lieu de plusieurs heures.

Il est alors possible d'effectuer des reconstructions d'images en trois dimensions comme le montre la section suivante qui met en avant des reconstructions 3D avec données simulées.

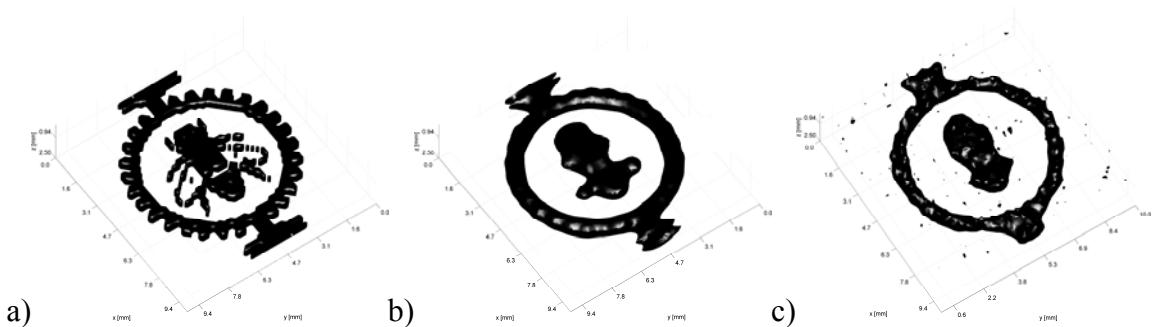
### 3.3.5 Exemple de reconstructions 3D en simulation

Voici quelques exemples de reconstructions 3D pour des données simulées avec et sans bruit. Les premières reconstructions correspondent à un fil à différentes profondeurs, Fig. 3.4. Ces reconstructions ont été effectuées pour un volume de  $10 \times 10 \times 2,5 = 250 \text{ mm}^3$  constitué de  $64 \times 64 \times 16$  soit 65536 voxels cubiques d'arête 156  $\mu\text{m}$  avec un fil simulé de 150  $\mu\text{m}$  de diamètre.



**Figure 3.5 :** Reconstructions de données simulées aux profondeurs de 0, 500, 1000, 1500 et 2000  $\mu\text{m}$ , a) Données sans bruit, b) Données avec RSB = 40, c) Données avec RSB = 20.

Pour vérifier la précision de la méthode de reconstruction, des données représentant une structure plus complexe ont été simulées, Fig. 3.6.



**Figure 3.6 :** Reconstructions d'une structure complexe, a) Données sans bruit, b) Données avec RSB = 60, c) Données avec RSB = 40.

Ces simulations de reconstructions 3D confirment la validité de la méthode Monte-Carlo ainsi que l'implémentation de la résolution du problème inverse.

## CHAPITRE 4

# CARACTÉRISATION DES PERFORMANCES DE L'IMAGEUR

Dans le chapitre 2, l'imageur par TOL a été décrit au niveau fonctionnement et matériel. Plusieurs propriétés qui permettent de caractériser et d'établir les performances de l'appareil ont été exposées théoriquement. Ce chapitre propose la vérification expérimentale de ces performances au travers de l'analyse de résultats préliminaires obtenus sur différents fantômes. La première section se concentre sur les propriétés optiques inhérentes au matériel utilisé pour la conception de l'imageur alors que la seconde section passe en revue les performances en termes de qualité d'image.

Pour caractériser cet imageur optique, quatre caractéristiques principales ont été considérées au cours de ce travail :

- le champ de vision,
- la résolution,
- le grandissement,
- la sensibilité,

qui ont été déterminées selon les contraintes liées à l'imagerie de l'activité neuronale de la moelle épinière du rat (Tableau 4.1).

**Tableau 4.1 :** Contraintes liées à l'imagerie de la moelle épinière du rat.

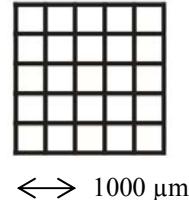
Dimensions de la moelle	80 mm × 2 mm
Dimensions de la zone d'intérêt	10 mm × 2 mm
Diamètre de la moelle	2 mm
Variations d'intensité lumineuse lors de la réponse hémodynamique	1%

La longueur n'est pas la contrainte la plus importante car on se concentre toujours sur une région d'intérêt particulière pour l'analyse des données. Par contre, l'imageur doit être capable de fournir des informations fonctionnelles sur toute la largeur de la moelle et sur la totalité de sa profondeur, i.e. mesurer des changements d'intensité lumineuse de 1% sur les 2 mm de diamètre de la moelle.

## 4.1 Propriétés optiques

### 4.1.1 Champ de vision maximal

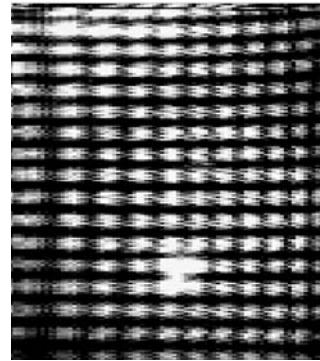
Pour établir le champ de vision maximal, une grille de calibration, Fig. 4.1, de 40 mm par 40 mm, constituée de carrés d'arête 500  $\mu\text{m}$  a été utilisée.



**Figure 4.1 :** Portion de la grille de calibration.

Chaque ligne de la grille a une épaisseur de 100  $\mu\text{m}$  déterminée par la résolution maximale de l'imprimante laser utilisée (HP Laserjet 5100 dtn, Hewlett-Packard).

Dans le chapitre 2, le champ de vision maximal théorique a été établi à 9,2 mm en x par 21,3 mm en y. Pour vérifier cela, l'imageur a été utilisé sur cette grille de calibration en réglant les miroirs de balayage à leurs angles de déflexion maximaux afin de connaître le champ de vision maximal réel.



**Figure 4.2 :** Image par TOL caractérisant le champ de vision maximal.

On constate dans 4.2 que l'imageur fournit des images des carrés sur 11 colonnes puis 16 lignes. Par conséquent, le champ de vision maximal effectif est de 5,5 mm par 8 mm. Le résultat expérimental est très éloigné de la théorie. Une des explications possibles est la différence probable entre les amplitudes réelles de rotation concernant les miroirs et celles fournies par le fabricant.

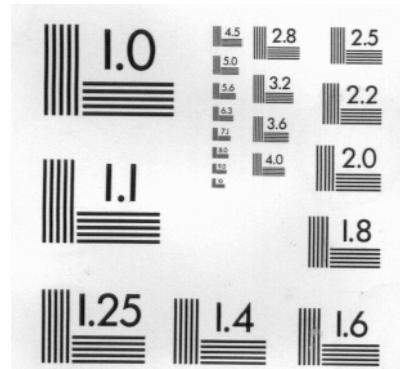
Cette image contient des déformations sur les côtés, elles sont dues au profil sinusoïdal du patron de lumière. Cette déformation et sa correction seront discutées plus tard dans ce chapitre. Ici, l'image observée est une image corrigée, cela signifie que la correction n'est pas optimale. Plusieurs hypothèses sont envisageables. La première est que la correction appliquée commet une erreur d'interpolation. Il est aussi possible que l'hypothèse d'un sinus parfait centré en zéro concernant la position du miroir oscillant et donc le patron lumineux soit erronée comme la déformation est plus importante à gauche. Enfin, il se peut que les lentilles utilisées dans le système engendrent des aberrations optiques et déforment les images obtenues. D'ailleurs, on peut constater une de ces aberrations en bas au centre de l'image avec une zone plus éclairée. Ce pic d'intensité lumineuse correspond aux résidus de réflexions internes existant dans ces lentilles. Bien qu'elles soient conçues pour atténuer autant que possible ces phénomènes, il reste toujours des défauts.

Cette grille de calibration est utilisée à chaque expérience afin de connaître les distances de travail de la zone imagée.

### 4.1.2 Résolution

La résolution théorique de l'imageur est déterminée par le nombre de pixels et la taille de la zone imagée. Dans le cas du champ de vue maximal, il y a 80 pixels sur une distance de 5,5 mm et 192 pixels sur une distance de 8 mm. On choisit délibérément de ne pas faire l'acquisition des 8 dernières lignes pour ne pas saturer le processeur de l'ordinateur. Ainsi la taille théorique d'un pixel est de 69  $\mu\text{m}$  en x pour 42  $\mu\text{m}$  en y.

Cependant, il ne faut pas oublier que cette résolution est forcément diminuée car elle subit une convolution par le diamètre du point lumineux utilisé pour générer le patron d'image. Pour obtenir la résolution réelle, une cible de calibration de microscope (MT-11, Stanford Computer Optics, Inc) est utilisée, Fig. 4.3. Cette mesure consiste à imager des lignes horizontales et verticales qui sont séparées par une distance indiquée sur la grille. Avec les angles de défexion maximaux, la résolution expérimentale obtenue est de 125  $\mu\text{m}$  en x pour 80  $\mu\text{m}$  en y. Cela semble impliquer que le diamètre du point d'illumination est donc au plus égal à 80  $\mu\text{m}$ . Ce résultat correspond au champ de vision maximal mais on constate qu'il varie avec la défexion des miroirs. En réduisant la taille de la zone imagée, la résolution maximale qu'il est possible d'obtenir est de 100  $\mu\text{m}$  en x pour 55  $\mu\text{m}$  en y. Au-delà, la zone à imager devient trop petite, il devient impossible de distinguer les lignes.

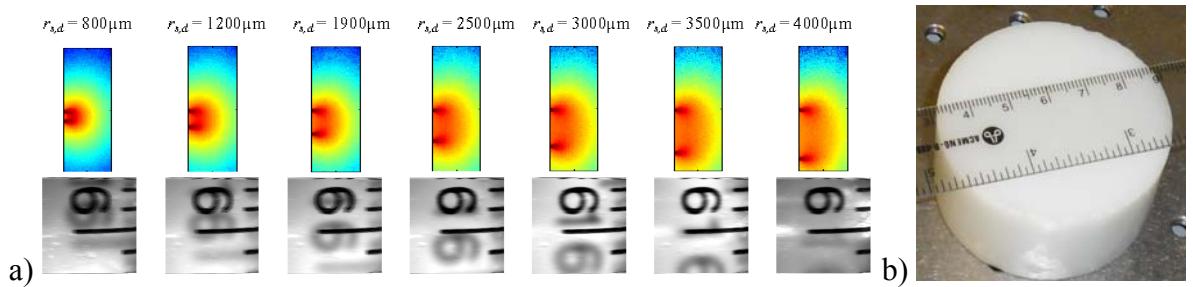


Il faut donc tenir compte de considérations temporelles pour établir la véritable résolution de l'imageur TOL. Comme les fréquences de rotation des miroirs sont fixes, réduire la taille du patron lumineux revient à augmenter le temps de balayage pour une même distance. Par conséquent, l'échantillonnage spatial est modifié vu que plus de points sont mesurés sur cette même distance, la résolution spatiale est alors améliorée et nous avons plus d'indication sur le diamètre du point d'illumination qui est donc au maximum de 55 µm. Ce type de mesure permet d'évaluer la résolution effective du système, malgré tout elle présente une limitation. La mesure est réalisée sur une cible microscopique en papier, donc il n'y a pas de phénomène de diffusion et ne permet pas vraiment d'évaluer avec précision la résolution sur les détecteurs qui récupèrent le signal de profondeur.

### 4.1.3 Grandissement

Le grandissement théorique de l'imageur est de 4. D'après la théorie de la diffusion vue dans le chapitre 3, les photons se propagent dans les milieux diffusants selon une « banane » entre la source et le détecteur. Ainsi lorsque l'objet imagé est placé dans un milieu diffusant, on constate l'apparition d'un deuxième objet « résiduel » dans l'image qui est justement séparé de l'objet réel par la distance source-détecteur. Dans la mesure où la distance source-détecteur sur la matrice est connue, il suffit de quantifier la distance source-détecteur sur le patron d'image pour obtenir le grandissement réel du système. Pour cela une règle plate transparente a été placée sur un bloc solide diffusant dans le but d'être imagée. Ce fantôme solide composé de résine de polyester, de dioxyde de titane, d'encre et d'éthanol pur reproduit l'absorption et la diffusion dans les tissus. Le mélange de ces produits dans les quantités souhaitées est passé aux ultrasons afin d'assurer une bonne homogénéité puis une réaction de polymérisation permet au mélange de durcir au bout d'une semaine. Pour éviter les phénomènes de réflexions indésirables dus aux aspérités de la surface, le bloc diffusant subit un polissage à grain très fin.

Les mesures effectuées sur la règle ont permis de quantifier le grandissement à l'aide des graduations de cette dernière, Fig. 4.4.



**Figure 4.4 :** a) Mesure expérimentale du grandissement, b) Fantôme solide.

On observe bien sur chacun des détecteurs le chiffre 6 résiduel (clair) qui s'éloigne de plus en plus du chiffre 6 réel (foncé). On constate que les distances source-détecteur expérimentales sont très proches de celles obtenues dans le chapitre 2. Les différences observées sont dues à des erreurs d'alignement optique. Le grandissement expérimental moyen est de 3,7 ce qui représente une erreur de 7,5 % vis-à-vis de la théorie.

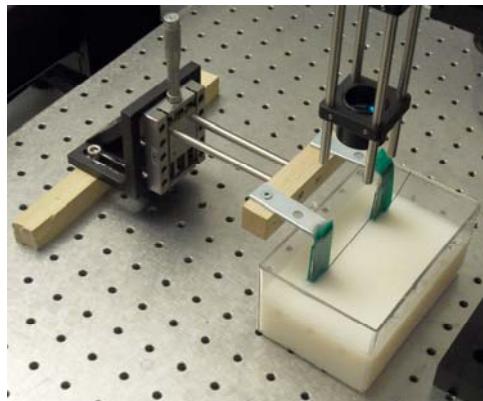
Par conséquent, l'imageur TOL permet un champ de vision de  $8\text{ mm} \times 2\text{ mm}$  avec une résolution d'au moins  $80\mu\text{m} \times 125\mu\text{m}$  et valide donc les deux premiers critères.

## 4.2 Mesures sur fantômes diffusants

La section précédente a présenté les propriétés de l'imageur relatives aux lois de l'optique géométrique. Cette section met l'accent sur les résultats préliminaires obtenus en imageant des fantômes ainsi que la caractérisation des performances de l'imageur sur le plan de la qualité des images et surtout de la sensibilité.

### 4.2.1 Description du fantôme utilisé

Les résultats suivants ont été obtenus en réalisant des mesures sur un tube rempli d'encre noire de diamètre interne 300 µm, dont la position sur l'axe z était contrôlée à l'aide d'une plate-forme de réglage micrométrique (Fig. 4.5). Le tube a été placé dans un mélange d'eau, d'intralipide et d'encre noire réalisé de manière à ce que les propriétés d'absorption et de diffusion soient équivalentes à celles des tissus biologiques. La préparation finale, dont les concentrations en intralipide et en encre étaient respectivement de 1% et 0.5%, avait un coefficient d'absorption  $\mu_a=0,1 \text{ cm}^{-1}$ . Des acquisitions à plusieurs profondeurs différentes ont été effectuées. Comme les données de seulement 7 détecteurs peuvent être enregistrées, le premier détecteur à la position de la source est éliminé pour privilégier l'information en profondeur.

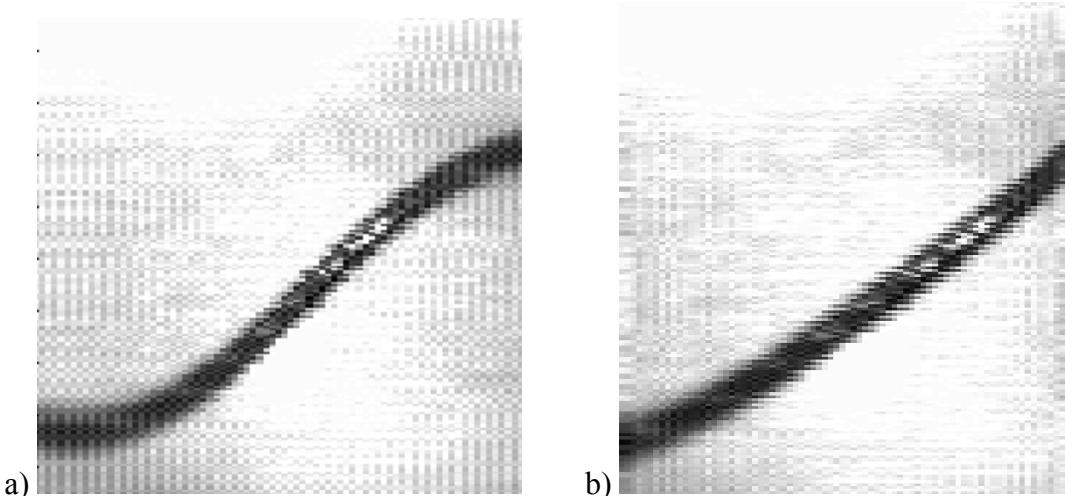


**Figure 4.5 :** Tube d'encre à profondeur contrôlée dans une solution d'intralipide.

### 4.2.2 Images de fantômes

Le parcours du faisceau laser définissant le patron d'image est sinusoïdal. Ce profil en sinusoïde est entièrement dû au mouvement caractéristique du miroir résonant à 1,5 kHz dont la position angulaire évolue selon une sinusoïde de cette même fréquence. Cette

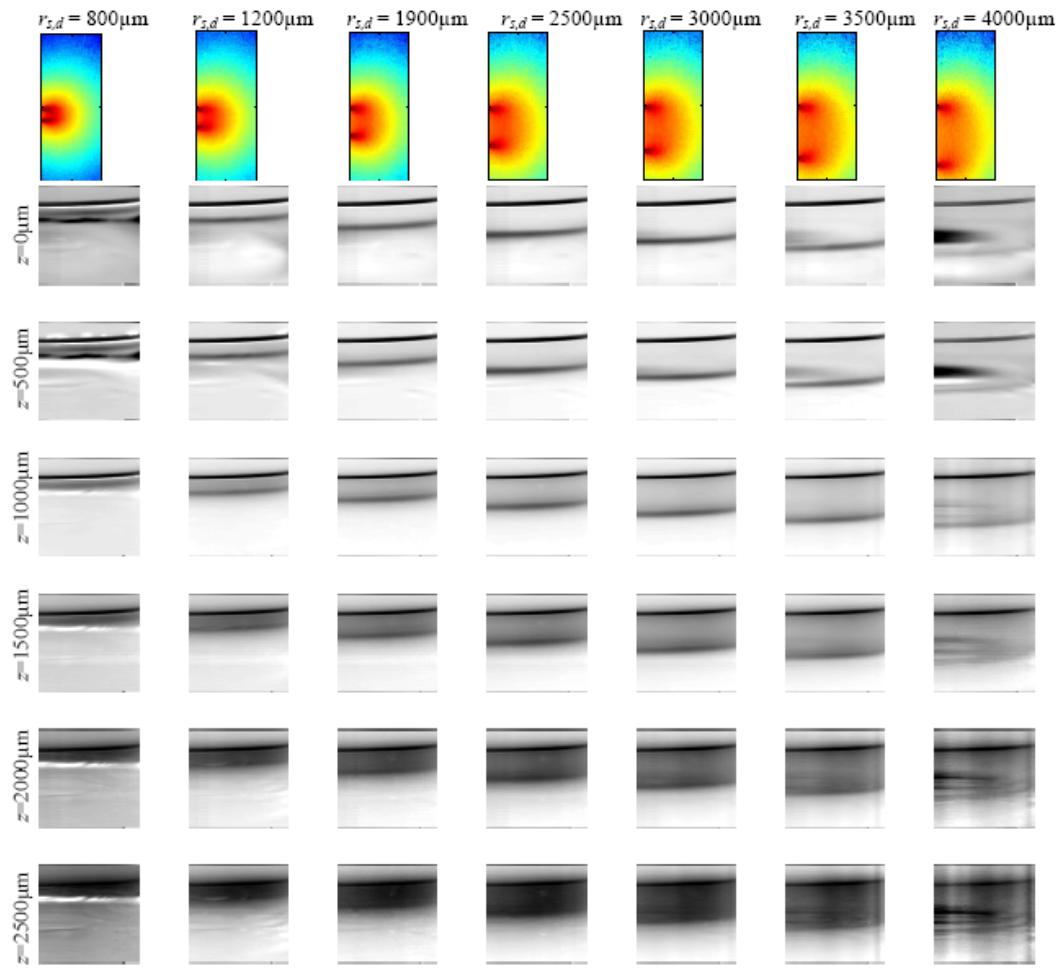
contrainte mécanique inhérente aux miroirs implique que beaucoup plus de points sont acquis sur les bords du patron qu'au centre. Par conséquent, il est nécessaire de corriger toutes les images obtenues en post-traitement en réalisant une interpolation sur la position réelle des pixels dans le patron d'image.



**Figure 4.6 :** a) Image non corrigée avec distorsion sinusoïdale. b) Image corrigée par interpolation de la position.

Cette déformation sinusoïdale se remarque bien sur l'image de gauche, le fil qui devrait être droit prend une forme en « S ». Cependant, on constate après interpolation de la position que le fil n'est toujours pas parfaitement droit, en particulier sur les bords de l'image. Il se pourrait que l'algorithme d'interpolation choisi ne soit pas optimal ou qu'une erreur soit réalisée au cours de ce dernier. Comme les caractéristiques des miroirs en termes de fréquence d'oscillation ont été vérifiées plusieurs fois, cet artefact ne provient pas d'un aspect mécanique ni analogique mais probablement numérique avec l'échantillonnage du signal à considérer.

La figure suivante présente les images obtenues par chaque détecteur à avalanche lorsque le système de TOL a été appliqué sur le tube rempli d'encre plongé à différentes profondeur.



**Figure 4.7 :** Résultats expérimentaux obtenus sur fantôme à différentes profondeurs. 0  $\mu\text{m}$ . 500  $\mu\text{m}$ . 1000  $\mu\text{m}$ . 1500  $\mu\text{m}$ . 2000  $\mu\text{m}$ . 2500  $\mu\text{m}$ .

Le lecteur peut constater sur la première ligne une tâche d'intensité très élevée. Ceci est dû à la réflexion spéculaire résiduelle. En effet, la surface du liquide change un peu et c'est surtout sa hauteur qui varie avec la profondeur du tube qui est tenu par deux tiges métalliques qui font augmenter le volume total. De plus, il est certain pour les profondeurs à 0 et 500  $\mu\text{m}$  que le fil n'étant pas complètement immergé, les forces de rappel s'appliquant sur le liquide engendrent des angles à la surface qui provoquent des artefacts de surintensité lumineuse. D'ailleurs, on ne les constate plus sur les profondeurs suivantes sur lesquelles on peut voir l'apparition d'une autre tâche de surintensité qui cette fois est

probablement due aux forces de Van der Waals qui s'appliquent entre les molécules d'eau et qui ont un effet sur la polarisation locale de la solution et agissent donc sur la propagation de la lumière.

Le fil est observable pour chaque profondeur sur tous les détecteurs. De même l'effet de « banane » est aussi assez visible d'un détecteur à l'autre. Quant au contraste observé à l'œil, il semble s'atténuer avec la distance source-détecteur mais aussi avec la profondeur d'immersion du tube.

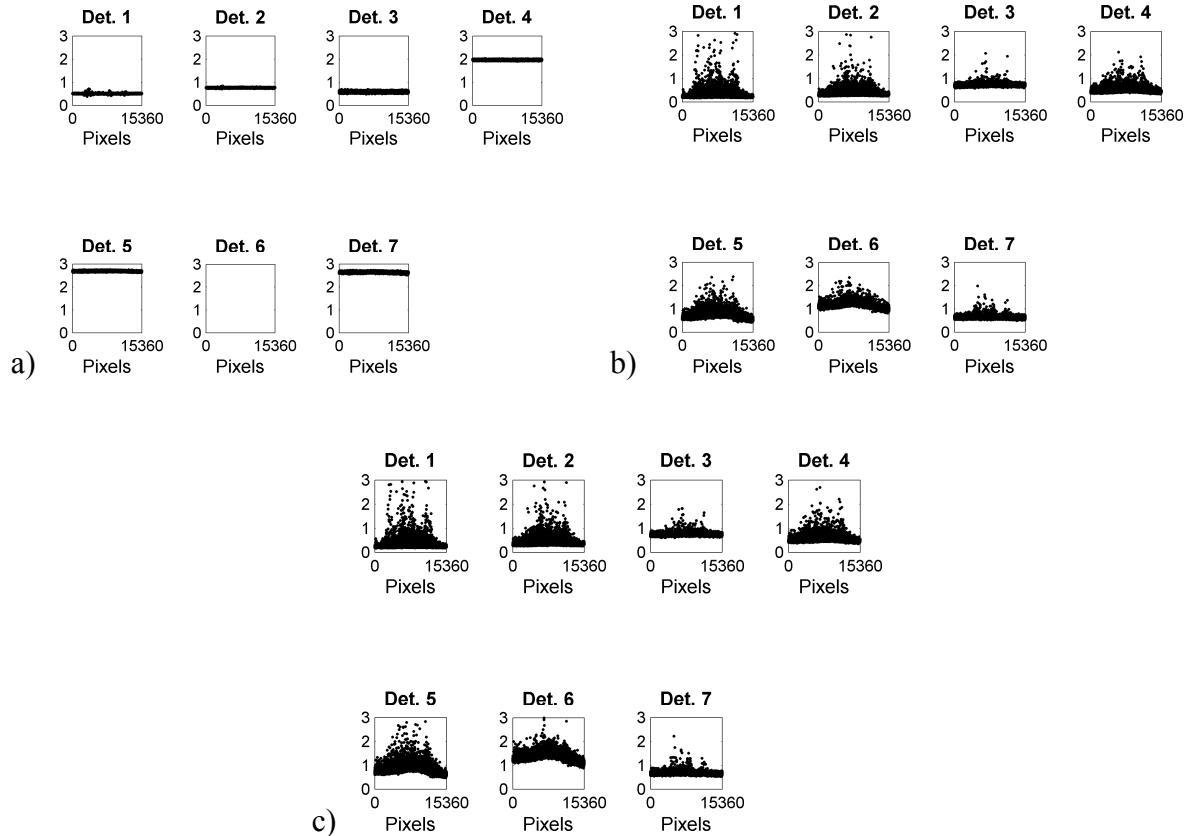
Ces phénomènes sont observés à l'œil, néanmoins il est nécessaire d'établir des performances quantitatives de cet imageur car la réponse hémodynamique lors d'une activation neuronale fait varier le signal détecté d'environ 1%. Par conséquent, des données de rapport signal sur bruit et de contraste local sont importantes pour être sûr que l'imageur par TOL est capable de relever de telles variations. Le paragraphe suivant présente plusieurs de ces caractéristiques en se basant sur les résultats précédents.

### 4.2.3 Quantification des performances

Avant même d'aborder les notions de rapport signal sur bruit (RSB) ou même de contraste local, il a été nécessaire de caractériser le bruit inhérent aux détecteurs à avalanche qui est donc introduit dans chaque image.

Selon la tension d'alimentation de ces derniers, leur gain change. Il existe alors deux phénomènes distincts : l'amplification par avalanche et le bruit. L'amplification due au voltage de biais augmente le signal mesuré ainsi que le bruit de base. Le contraste observé est donc une combinaison de ces deux facteurs. Le rapport signal sur bruit (RSB) est alors proportionnel au voltage d'amplification sur le bruit du détecteur à ce voltage. Le meilleur gain a donc été recherché pour obtenir le RSB le plus grand possible. Pour cela des mesures ont été réalisées pour différentes tensions d'alimentation, Fig. 4.8. L'acquisition consistait à imager une zone d'un milieu solide diffusant sans illumination par la source laser. Ainsi, il

a été possible d'établir le bruit des détecteurs dans le noir et d'étalonner le pourcentage de bruit suivant le gain pour chaque détecteur, Fig. 4.9.



**Figure 4.8 :** Pourcentage de bruit par pixel par détecteur selon la tension d'alimentation. a) 408 V. b) 410 V.  
c) 413V.

On remarque sur le détecteur 6 que le pourcentage de bruit n'est pas visible à 408V. On ne le montre pas car il est hors échelle comparé aux autres détecteurs, il est égal à plus de 20% sur la totalité d'une image alors que les autres sont inférieurs à 3%. On peut émettre deux hypothèses différentes pour expliquer cet écart très important. On peut d'abord considérer la possibilité de l'erreur expérimentale qui entraîne l'apparition d'une valeur aberrante, ensuite on peut attribuer ce phénomène au détecteur lui-même qui pourrait être moins efficace que les autres pour cette tension d'amplification à cause d'un défaut de fabrication.

Finalement, le pourcentage de bruit se définit comme l'écart-type de plusieurs mesures du signal de référence divisé par le signal de référence moyen. On établit donc à partir des données précédentes le pourcentage de bruit sur chaque détecteur en fonction de la tension d'amplification.

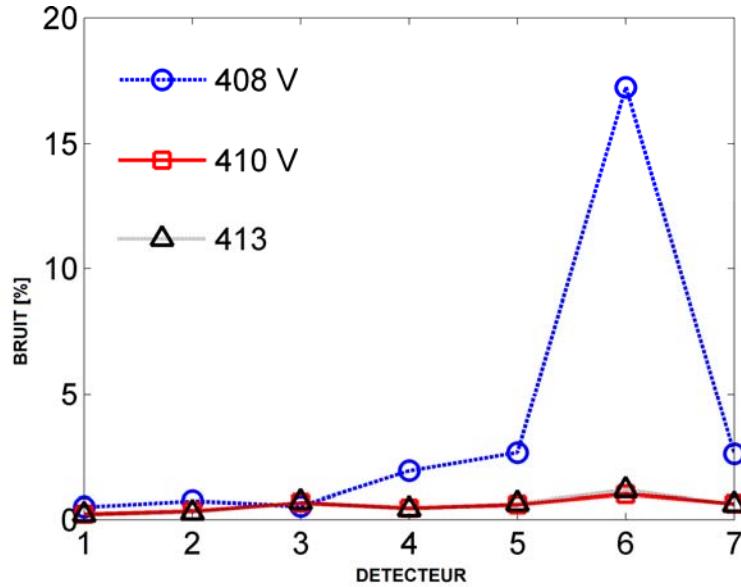


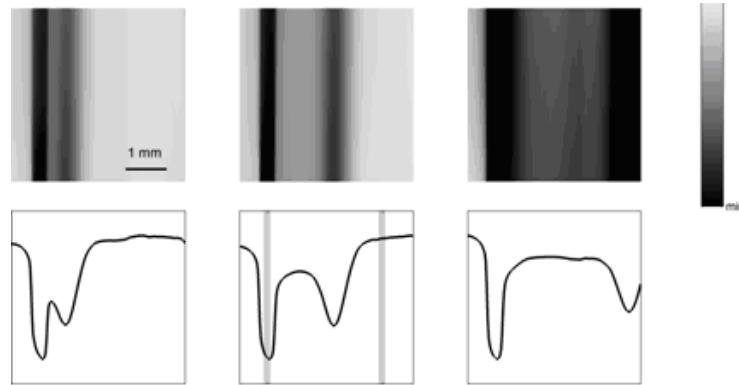
Figure 4.9 : Étalonnage du pourcentage de bruit des détecteurs selon leur gain.

On constate un pic de bruit sur le sixième détecteur à 408 V. Cela s'explique par le fait que le bruit est le plus fort sur ce détecteur pour les raisons décrites précédemment.

Le bruit introduit par les détecteurs étant connu, il faut alors quantifier le contraste local et aussi le rapport signal sur bruit pour chaque détecteur en fonction de la profondeur d'observation.

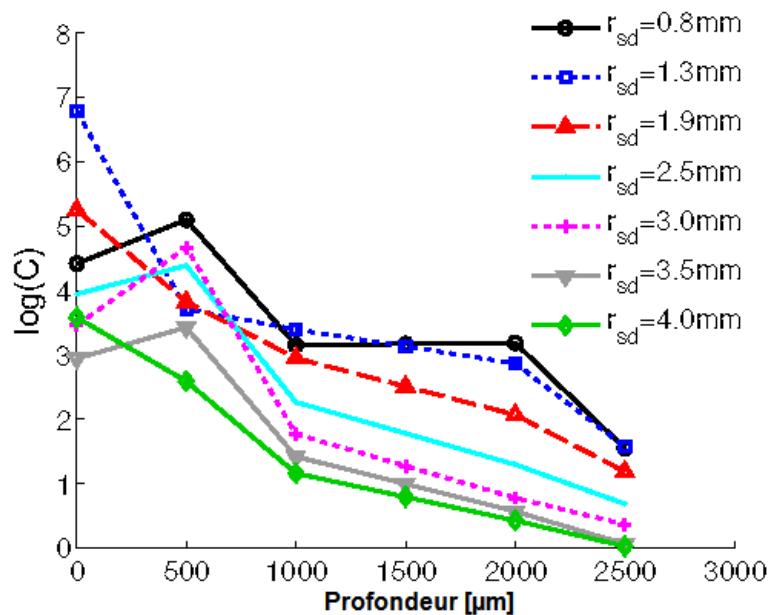
On choisit une région d'intérêt dans l'objet, le tube en l'occurrence, et une autre région de même taille dans la zone de référence, Fig. 4.10. On définit la moyenne d'intensité de la région de l'objet ( $f_{obj}$ ) et celle de la région de référence ( $f_{réf}$ ). Le contraste local, Fig. 4.11, se calcule alors ainsi :

$$C = \frac{f_{obj} - f_{ref}}{f_{ref}}. \quad 4.1$$



**Figure 4.10 :** Ligne du dessus : Images de fantôme. Ligne du dessous : Profil d'intensité lumineuse du fantôme.

On établit ainsi un étalonnage du contraste pour chaque détecteur en fonction de la profondeur du fil.

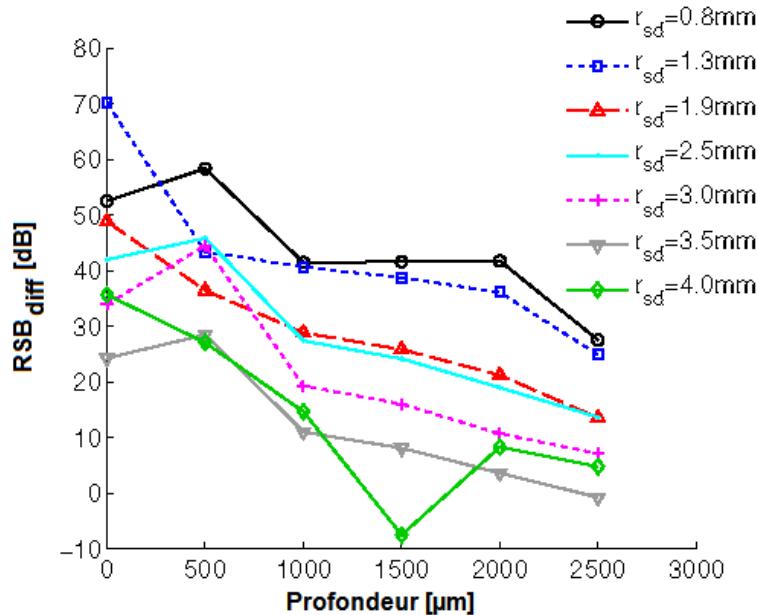


**Figure 4.11 :** Contraste local par détecteur en fonction de la profondeur.

Enfin, on peut calculer le rapport signal sur bruit différentiel, Fig. 4.12, qui est directement relié au contraste local. On le calcule ainsi :

$$RSB_{diff} = \frac{f_{obj} - f_{ref}}{\sigma_{ref}} \quad 4.2$$

avec  $\sigma_{ref}$  étant la fluctuation du bruit dans le milieu de référence (i.e. le mélange à base d'intralipide).



**Figure 4.12 :** Signal sur bruit différentiel par détecteur en fonction de la profondeur.

Ainsi ces quantifications viennent confirmer les thèses émises à partir de l'observation des images. Mis à part quelques valeurs aberrantes, le RSB ainsi que le contraste local diminuent avec la séparation source-détecteur mais aussi avec la profondeur d'activation. D'après ces dernières quantifications, si la tension d'amplification est choisie de façon adéquate, l'imageur TOL permet de mesurer des variations d'intensité lumineuse de l'ordre de 1% jusqu'à une profondeur de 2,5 mm, ce qui valide les deux derniers critères.

Par conséquent, la réponse hémodynamique à la suite d'une activation neuronale devrait pouvoir être mesurée.

Les performances de l'imageur étant connues et validant tous les critères initiaux liés aux contraintes d'imagerie, le système de TOL a pu être utilisé pour des expériences *in vivo* sur des rats dont les résultats ont fait l'objet d'un article, déposé en soumission en novembre 2009 à Optics Express (Optical Society of America) et présenté dans le chapitre suivant.

## **CHAPITRE 5**

# **ARTICLE 1: LAMINAR OPTICAL TOMOGRAPHY OF THE HEMODYNAMIC RESPONSE IN THE LUMBAR SPINAL CORD IN RATS**

Ce chapitre est constitué de l'article portant le même nom, soumis à Optics Express en novembre 2009, et dont les co-auteurs sont Edgar Guevara, Simon Dubeau, Eric Beaumont et Frédéric Lesage. Ce document présente les résultats obtenus lors d'une étude menée sur la détermination de la réponse hémodynamique dans la moelle épinière du rat. Après avoir posé le contexte général et décrit l'appareillage utilisé, l'article expose les principaux résultats obtenus. Il aboutit à la détermination de l'évolution temporelle moyennée de l'activation neuronale de la moelle épinière sur plusieurs profondeurs d'observation suite à une stimulation d'un des membres inférieurs, à une comparaison et une corrélation entre l'activité neuronale de la moelle épinière et celle du cortex subséquentes à cette même stimulation, et enfin à une carte tridimensionnelle de l'activité neuronale présente dans la totalité de la moelle. Cet article constitue donc une preuve de concept de l'application de la TOL sur la moelle épinière du rat.

## 5.1 Abstract

Intrinsic optical imaging emerged as a very powerful tool to study neuronal function in the small animal. Although it has been extensively used in the brain, its application to the spinal cord is rare. The inability of intrinsic optical techniques to resolve different depths and the embedded gray matter hampers its ability to distinguish larger vasculature contributions from the hemodynamic signal originating from motoneurons and interneurons activations. Laminar Optical Tomography (LOT) is a technique recently developed that fills the gap left between intrinsic optical imaging and diffuse optical imaging. When using distinct source-detector separations, light that propagated deeper in the tissue can be distinguished from light originating from the surface providing depth sensitivity. In this work, LOT is investigated for the first time to image spinal cord activations with simultaneous intrinsic optical imaging of the cortex in rat. This proof of concept provides a powerful imaging pathway to study spinal cord activation and disruption following lesions.

## 5.2 Introduction

Approximately 12 000 spinal cord trauma cases happen each year in North America (SPINALCORD: Facts & Figures at a Glance) and the emergence of new neuronal recording techniques is crucial in understanding the post traumatic neuronal reorganization. In animal models, it is known that the disruption of the descending neuronal tracts after spinal cord injuries (SCI) decreases the locomotor performance of the limbs caudal to the lesion site at various degrees, depending on the severity and the location of the lesion (Basso et al. 1996, Basso et al. 2002, Magnuson et al. 1999, Schucht et al. 2002, Mendell 1984). It is established that following SCI, a functional and structural reorganization occurs

(Schucht et al. 2002). Increased sprouting and synaptic reorganization are thought to combine with the reduction of supraspinal descending pathways to modulate clinical conditions associated with injuries such as bladder dysfunction, chronic neuropathic pain, autonomic dysreflexia, locomotion capacity and spasticity. Conventional electrophysiological recordings have detected increased lumbar spinal excitability after SCI (Mendell 1984, Valero-Cabré et al. 2004). Recent work (Endo et al. 2008) with BOLD functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI) showed increased sensitivity to stimulation after 3 to 6 months post SCI, thus exploring potential causes for neuropathic pain and autonomic dysreflexia.

The spinal cord is very difficult to study in-vivo with conventional electrophysiological techniques. High field fMRI can be used to image neuronal function but the small size of the cord, physiological motion and susceptibility artefacts have hampered fMRI studies so far and clear and consistent results have only recently been published (Maier et al. 2007, Stroman et al. 2002b, Stroman et al. 2003, Stroman et al. 2005, Stroman et Ryner 2001). The contrast mechanism for BOLD is the same as for brain however, detection is still a challenge even in the presence of strong stimuli (Govers et al. 2007, Zhao et al. 2008). Evidence of the reorganization in the spinal cord below the injury has been studied with BOLD fMRI (Endo et al. 2008) but issues with vasculature disruption caused by the lesion may bias the results and were not discussed by the authors.

Intrinsic optical imaging is emerging as a very powerful tool to study neuronal function in the small animal. Although it has been extensively used in the brain, its application to the spinal cord is rare. Movements, animal preparation, inversion of the gray and white matter when compared to the cortex lead to increased experimental and methodological complexity. In particular, the inability of intrinsic optical techniques to resolve different depths lead to issues with spinal cord applications. The embedded gray matter hampers their ability to distinguish larger vasculature contributions from the hemodynamic signal originating from motoneurons and interneurons activations. This may explain why the spinal cord has not been explored extensively in the optics literature, except for the cervical area (Sasaki et al. 2002). Laminar Optical Tomography (LOT) is a technique recently

developed that fills the gap left between intrinsic optical imaging and diffuse optical imaging. Its principle is based on a fast scanning light source and detectors across the surface of the tissues to be imaged. When using distinct source-detector separations, light that propagated deeper in the tissue can be distinguished from light originating from the surface leading to depth sensitivity. Combining LOT measurements with an accurate light propagation model, image reconstruction algorithms can provide 3D images of hemodynamic with high spatial accuracy.

In this work, LOT spinal cord imaging is investigated for the first time to establish whether it can be used to investigate spinal cord neuronal activations in anaesthetised rat. Simultaneous intrinsic optical imaging of the brain and LOT imaging of the spinal cord is performed following hind paw stimulation. The results indicate that LOT is able to image neuronal activation in the spinal cord and that simultaneous imaging of the spinal cord and brain is possible. This proof of concept will provide the starting point for further studies to investigate spinal cord lesions.

## 5.3 Methodology

### 5.3.1 Animal preparation

Surgical procedures were performed according to the recommendations of the Canadian Council on Animal Care, and were approved by the animal ethics committee of Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal. A total of n=2 female Sprague-Dawley rats (300 to 360 g) were used. The rats were anaesthetized with isoflurane (5%), and body temperature was maintained at 37°C with a heating blanket (Harvard). Stimulation was provided by bipolar stainless steel electrodes implanted in the left hind paw. Both heart rate (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) and expired CO<sub>2</sub> level (Capstar 100) were monitored. A tracheotomy was performed and the rats were artificially ventilated (Kent Scientific, Torrington, CT) with ambient air. Their breathing rate was maintained between 60 and 80 cycles/min, with

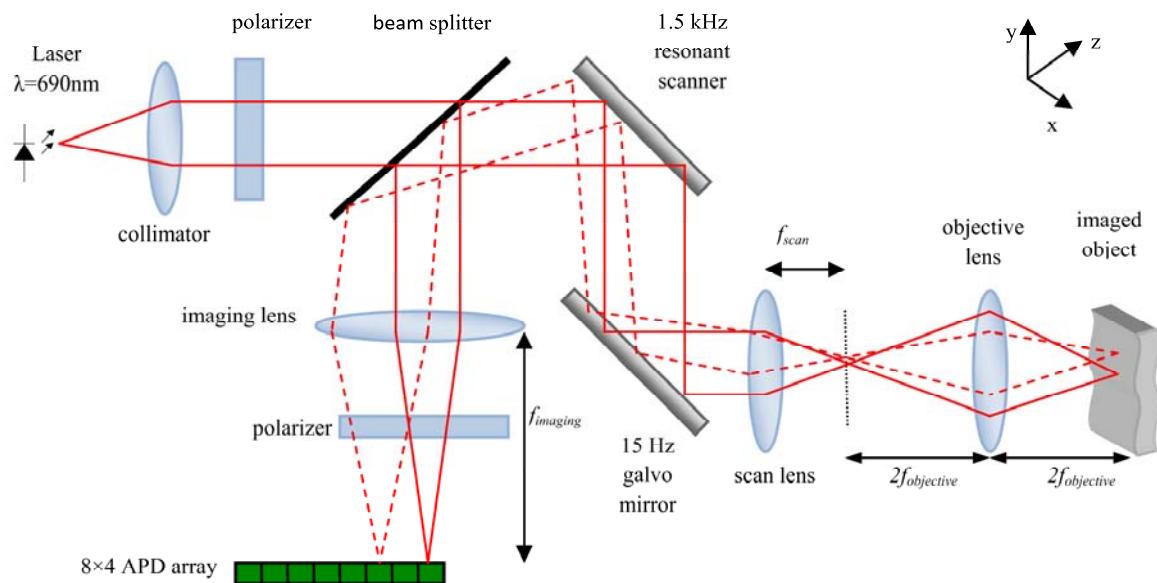
approximately 2-ml tidal volume and set to obtain an end tidal expired CO<sub>2</sub> concentration of 3%. The rats were then positioned on a custom-made stereotaxic frame, and lumbar spinal cord segments from the thoracic (T10) to the sacral (S1) area were exposed by laminectomy. Isoflurane administration was stopped after surgery; the animals were then anaesthetized with alpha-chloralose (first by a 50 mg/kg bolus and then by 40 mg/kg/h). Thirty minutes were allowed for animal stabilization. Mineral oil was added to prevent drying of the spinal cord, and 2 sets of clamps were applied on the vertebrae to prevent any longitudinal spinal cord movement induced by breathing. The surrounding area of the spinal cord was covered with Gelfoam (Pharmacia & Upjohn, Sumerset County, NJ) to prevent bleeding. For concurrent brain imaging, the cortex was also thinned to a thickness of around 100 µm over both somatosensory cortex. The exact location where the afferent signal is the highest was located at 3mm lateral and 1mm caudal from Bregma.

### 5.3.2 Acquisition system

The LOT experimental setup used in this study has been described in detail in other papers (Hillman et al. 2004, Hillman et al. 2006a, Hillman et al. 2006b, Hillman 2006, Hillman et al. 2007, Yuan et al. 2009), but the main features of the system are briefly mentioned here. Figure 5.1 shows the schematic of the LOT system. The system is illuminated by one laser diode (HL6738, Opnext Inc., 690 nm) which outputs a beam that is collimated, linearly polarized and then sent into the beamsplitter (50:50, 25.4 mm diameter). The beam emerging from the beam splitter is incident into the scanning system consisting of two scanning mirrors. In order to achieve a high frame rate and an adequate number of pixels in the digitized images, the scanning device uses a resonant scanner (SC-10 with driver PLD-XYG, Electro-Optical Products Corp.) that oscillates sinusoidally at a pre-set resonant frequency of 1.5 kHz. The second scanner controlled by that same driver is a galvanometer mirror (6810P, Cambridge Technology, Inc.) operating at 15 Hz to provide a linear frame-scan with an effective frame rate of 7.5 frames/s. The magnitudes of the scanning angles of

the mirrors can be adjusted adjusting in turn the field of view (FOV) of the system. The beam reflects from the galvanometer mirror and is focused by a scan lens ( $f_{scan} = 25.4$  mm, 25.4 mm diameter) on an intermediate focal plane. This plane is then imaged directly into the sample by an objective lens ( $f_{objective} = 50$  mm, 25.4 mm diameter). Light re-emitted from the imaged object passes back up through the objective and scan lens and onto the scanning system, where it is de-scanned and reflected towards the detection plane by the beam splitter. A second polarizer is placed before the detector array to reduce the effect of specular reflections (Yuan et al., 2009). An 4×8 avalanche photodiode detector (APD) array (S8550, Hamamatsu Photonics K.K., Japan) is positioned in this plane, capturing light at different radial positions relative to the centre of the scanning spot, which is focused on the first element, although it was not employed for acquiring data, because the signal contained some specular reflection even though crossed-polarizers were used. In the experiments below only one line of 8 elements is used. Each APD element is recorded by an analog input channel in the data acquisition card (16 bit, 8 channels, 250kS/s per channel, PCI-6143, National Instruments). Data acquisition is synchronized with the galvanometers movement with a custom made graphical user interface developed in LabView™ (National Instruments). The formed images are equivalent to tomographic reflectance measurements from  $192 \times 80 = 15,360$  source positions (over a  $5.5 \times 8$  mm<sup>2</sup> maximal FOV) and  $192 \times 80 \times 7 = 107,520$  detector positions. The size of the detection spot on the sample is 0.64 mm<sup>2</sup>. The system was validated on liquid phantoms.

The minimum and maximum source-detector distances are respectively 575 and 4025 µm, allowing detection of absorption variations at depths down to approximately 2.5 mm according to Monte-Carlo simulations.



**Figure 5.1 :** Experimental setup: LOT system design.

Optical intrinsic images were acquired with a 12-bit CCD camera (CS3960DCL, Toshiba Teli) with 1,392 x 1,040 resolution and 6.45- $\mu\text{m}$  pixel size. A separate custom-made LabView™ interface (National Instrument, Austin, TX) served to control the camera, record images, synchronize acquisition and electrical stimulation, and to change the illumination. A Nikkor Macro lens ( $f = 50$  mm) was used having a small focal depth (350  $\mu\text{m}$ ). Functional images of the brain were recorded under multiple hashing illumination (525, 590, 637 nm) produced by high-power LEDs (Optek Technologies, Carrollton, Texas.). Illumination was set so that no part of the brain was under- or over-saturated by any of the wavelengths.

### 5.3.3 Imaging protocol

This setup was used in order to image the functional activity in the spinal cord of two uninjured rats. They were both stimulated with  $N = 29$  blocks of 60 seconds. Each

stimulation block had 1-s duration and a 20-s inter-stimulus interval. The stimulus consisted of a 3 Hz repetition of 3-ms current pulse delivered by a current electrical stimulator (A-M Systems, Wa, Model 2200). Intensity was adjusted depending on the previously measure muscular threshold. The typical muscular threshold value was 1 mA, and stimulation intensities were done at 0.9X, 1.2X and 1.5X threshold interlaced. Simultaneously intrinsic optical imaging was performed on the somatosensory cortex for the purpose of comparing and correlating the functional activity in both parts of the central nervous system. With the illumination wavelength of 690 nm used, HbR (deoxy-hemoglobin) is the principal chromophore providing absorption contrast. The scanning zone was located in the Lumbar section with a length of 7.5 mm and a width of 2.5 mm along the dorsal vein. Two configurations were studied separately on the two animals to investigate the best orientation for LOT imaging in the cord. In a first the source and detectors were lined perpendicular to the rostral-caudal axis. In this configuration, detectors and sources had limited scanning area on the cord and while results confirmed a hemodynamic response, it was not as robust as the second configuration. In the second configuration, used below to describe results, the source-detectors were parallel to the rostral-caudal axis.

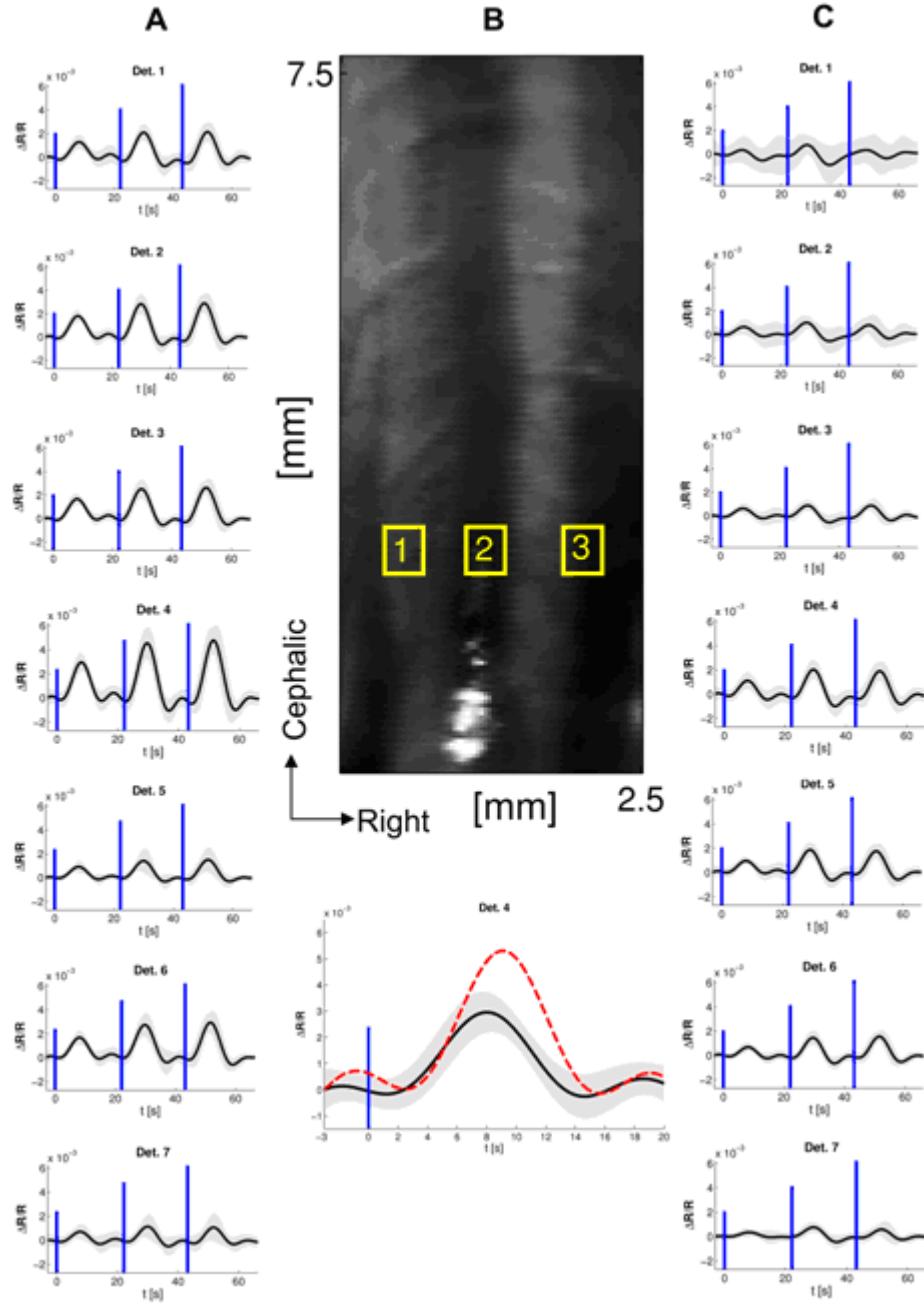
## 5.4 Results

Fig. 5.2B shows a reflectance image of the scanning zone obtained with LOT system. This image generated with the first detector, which is closest to the source, displays features corresponding to superficial vasculature of the exposed spinal cord. Three regions of interest were chosen to plot the absorption variations time course, the first in the ipsilateral side with respect to stimulation, the second in the contralateral side and the last one in the dorsal vein. Following sciatic nerve stimulation, neural activation will lead to increased blood flow and blood volume decreasing the local HbR concentration. Local absorption of light at 690 nm decreases correspondingly, so an increase of reflected light is expected.

Fig. 5.2 displays the recorded signals on all seven detectors following stimulation; the signal intensity in the ipsilateral region (Fig. 5.2A) presents a slight dip followed by a notable increase on each detector. The stimulations of 0.9X, 1.2X and 1.5X muscle threshold were interlaced and the curves clearly show the increased hemodynamic response with stimulation intensity over the 60 second period that was averaged. Signal to noise ratio was high as confirmed by the standard deviations displayed in gray.

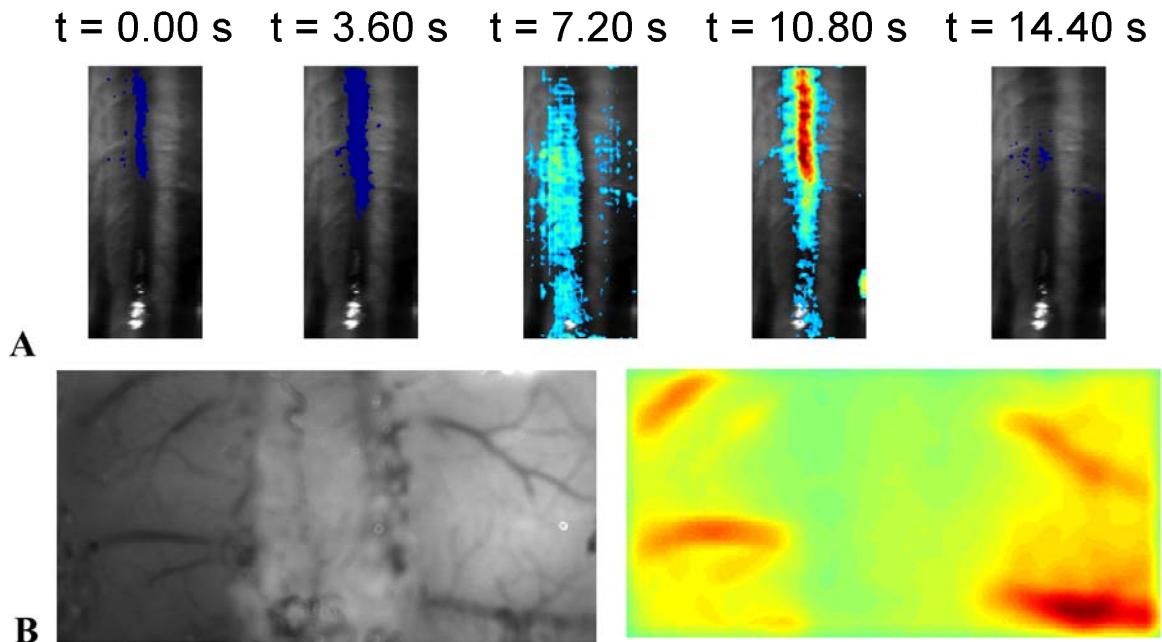
While the magnitude of the response depends on the intensity of the stimulation it also depends on the source-detector pair reflecting depth of activation. The absorption variations are observed to be more important on the second, third, fourth and sixth detectors with the fourth detector being the strongest. This is consistent with the location of the gray matter inside the spinal cord and confirms the ability of LOT to distinguish the different layers.

On Fig. 5.2C, a contralateral activation is also observed but with lower magnitude (about half) than the ipsilateral activation on Fig. 5.2A and with a greater variance confirming the predominance of ipsilateral activation in spinal cord. This is not unexpected as the sensitivity of the measurements with separated source and detectors follow a banana pattern that is also extended in the ipsi-contra-lateral axis. The blood is then drained through the venous system and particularly the dorsal vein. At the bottom of Fig. 5.2B, the time course of reflectance in a region of interest in the vein indeed shows a coherent time delay of approximately 1s between the ipsilateral response and the vein response.

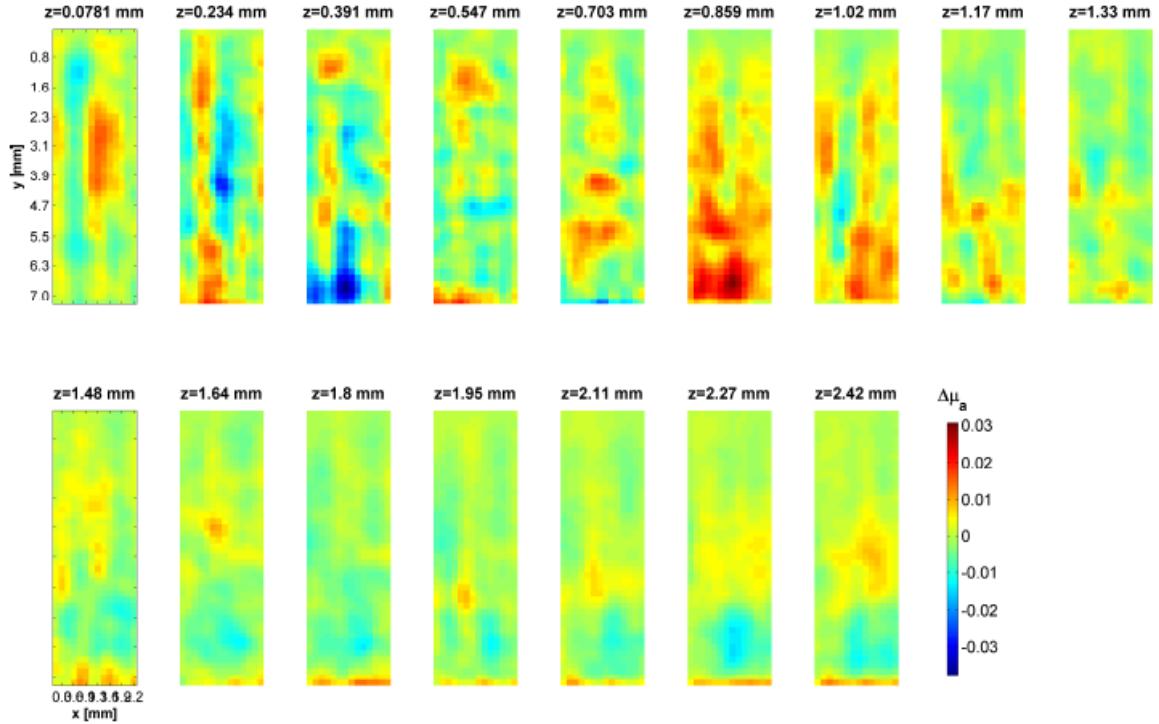


**Figure 5.2 :** LOT hemodynamic response with left hind paw stimulus intensity at  $0.9\times$ ,  $1.2\times$  and  $1.5\times$  muscle threshold in normal rat, vertical lines indicate stimulus onset. Shadowed area indicates mean  $\pm$  standard deviation,  $N = 29$  blocks of 60 seconds. (A) Averaged time course of region 1, which is ipsilateral to stimuli. (B) Top: Imaged area of the exposed spinal cord, the bright spot located at the lower part is due to specular reflection artefacts. Bottom: Time course (red dotted line) of region 2, corresponding to the superficial blood vessel shows  $\sim 1$  s delayed activation with regard to ipsilateral activation. (C) Time course of region 3, contralateral to stimuli. In this region smaller amplitude and greater deviations are observed when compared to ipsilateral response.

Given that the main goal of the development of this LOT system was to study partial lesions, the feasibility of performing concurrent intrinsic optical imaging on the somatosensory cortex while the spinal cord was being imaged by LOT was studied. Fig. 5.3 displays simultaneous measured activation in the cortex and spinal cord confirming the ability of our system to perform such measurements. Panel (A) shows the time course of LOT signals in the spinal cord after stimulation. The expected behaviour described previously by the curves of Fig. 5.2 can be localised spatially. The initial slight dip is locally observed in the dorsal vein at 3.6 s then an increase appears in the left side on the cord at 7.20 s. Blood is finally drained through the dorsal vein at 10.80 s. Contrary to the cortex where the hemodynamic response following a hind paw stimulus is contralateral, the spinal cord response is ipsilateral. Panel (B) illustrates the intrinsic optical signal of somatosensory cortex which appears mostly contralateral to stimulation as expected.



**Figure 5.3 :** (A) Time course of LOT signals induced by left hind paw stimulation collected over 15s at  $0.9\times$  muscle threshold. (B) Maximum intrinsic optical signal acquired on somatosensory cortex simultaneously.



**Figure 5.4 :** Three-dimensional map of neural activation in the spinal cord induced by left hind paw stimulation at  $0.9 \times$  muscle threshold. We observe ipsilateral activation around  $z = 0.8 - 1\text{mm}$  consistent with neuronal activation of interneurons.

LOT data were combined with a Monte-Carlo model of light propagation and a Born approximation in order to reconstruct 3D images of neural activation of the whole spinal cord volume. The data on each source-detector pair was initially averaged between 4.5 and 9 seconds post-stimulation to generate measures for the inverse problem and a differential measure with respect to the measure taken 3 seconds prior to stimulation was constructed. A three dimensional mesh with voxel size of  $150\mu\text{m}$  was used. The mesh used for reconstruction was:  $16 \times 48 \times 16$  in x, y and z respectively. The inverse problem was performed with Tikhonov regularization. The regularization parameter was optimized for a similar noise level to that measured separately for the same system in liquid phantoms. Figure 5.4 shows the results of the reconstruction after a smoothing process provided by a convolution kernel filter with impulse response function given by

$$h = \frac{1}{16} \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 2 & 4 & 2 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix}. \quad 5.1$$

On the superficial layers, most of the signal seems to be concentrated in the dorsal vein as expected from the anatomy. From 850  $\mu\text{m}$  to 1100  $\mu\text{m}$ , the activation is strong and ipsilateral and also corresponds to location of the gray matter in the cord. Below 1600  $\mu\text{m}$ , the signal is more diffuse and weaker but a diffuse contralateral activation is observed deeper in the volume. At the lower part of the image, a strong activation is in fact interpreted as an artifact from the measured data at that location where there is a small remaining specular reflection as can be observed in Fig. 5.3. The signal from the dorsal half of the spinal cord is representative of the activation of the interneurons (Willis et Coggeshall 1991) and it is ipsilateral in accordance with expectations. Further studies will be required to establish the ability of the system to measure motoneurons activation.

## 5.5 Discussion

For the first time, Laminar Optical Tomography has been used for the spinal cord imaging in the rat. The preliminary results obtained present a high SNR and spatial resolution and are indicative of neural activation and its localisation. Temporal resolution was shown to be good enough so that the time course of response to stimuli can be established. Moreover the sensitivity of the system allowed the recovery of depth-resolved signal. Indeed, in all detectors, a reproducible response was measured in LOT with intensity proportional to the strength of the stimulus but also to the source-detector distance. The observed signal was observed to be stronger in the middle of the cord which is coherent with the anatomy of the spinal cord. Previous intrinsic optical imaging (IOI) approaches also provided neural activation maps but only the first hundred microns of the spinal cord can be imaged with such a technique. The origin of the optical signal in the latter case was thus more difficult to

interpret due to the presence of large vasculature at the surface. Here, laminar optical tomography lifts the ambiguity left by intrinsic imaging and is expected to become a useful tool to investigate the spinal cord in the small animal.

The combination of intrinsic optical imaging and LOT has been demonstrated to image both cortex and spinal cord. The proof of principles provided here confirms that simultaneous brain and spinal cord measures can be compared and correlated. This is expected to open new horizons for the study of spinal cord injuries, in particular in the case of partial lesions. Since it is known that vasculature organization and neural activation of the spinal cord change after a SCI (Lesage et al. 2009), it may be relevant to study how the cortex adapts to this reorganization.

While the 3D activation maps recovered in this work provide a volumetric view of activation, it is difficult to fully interpret the results since they only convey amplitude. For example, the observation of a contralateral activation deep in the spinal cord should be investigated in view of a sensitivity analysis of the reconstructed solutions as a function of depth. To bring LOT into a *bona-fide* neuronal technique, statistical measures akin to those used in fMRI (e.g. SPM, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>) should be developed to provide statistical maps of activation rather than simple amplitude reconstructions. The statistical information would provide a more accurate assessment of activation and this will be the subject of future work.

Another limitation of our study is that the actual 3D reconstructions performed used a homogeneous model for light propagation. This is not optimal for the spinal cord, and future improvements will include reconstructions in a model that is anatomically realistic. With this new model and the addition of source with wavelength adapted to the absorption of HbO, it will also be possible to discriminate the concentration of HbO and HbR and make the distinction between the contribution of the venous, the arteriolar and the capillaries system.

## 5.6 Conclusion

This preliminary study confirmed that LOT can be used to image the spinal cord with high SNR and spatial accuracy. The concurrent intrinsic imaging of the brain and coherent activations observed opens new avenues to study spinal cord lesions. We hope to pursue lesions studies in the near future.

### *Acknowledgments*

This work was supported by grants from the Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal and the Natural Sciences and Engineering Research of Canada (NSERC) to F.Lesage and E. Beaumont. E. Guevara acknowledges financial support from the Mexican National Science and Technology Council (CONACYT) through scholarship No. 304501 and the Secretariat of Public Education (SEP).

## CHAPITRE 6

### DISCUSSION GÉNÉRALE

Les objectifs qui ont été fixés au début de ce travail ont tous été atteints. Néanmoins, ce projet n'en est qu'au stade embryonnaire et doit se poursuivre pour atteindre sa finalité qui est la compréhension de la réorganisation de la plasticité neuronale après une lésion médullaire. Pour atteindre ce but, plusieurs étapes doivent être franchies et des améliorations doivent encore être apportées. Ce chapitre propose de faire le point vis-à-vis du mandat énoncé dans l'introduction du mémoire en reprenant les objectifs décrits et propose de discuter leur impact ainsi que les améliorations envisageables qui peuvent être proposées.

#### **O1. Développer un système d'imagerie par TOL adapté à la moelle épinière du rat.**

Après plusieurs essais, la version actuelle de l'imageur remplit finalement les conditions d'application relatives à l'imagerie de la moelle épinière du rat. L'objectif initial a été rempli, le système est opérationnel dans sa présente configuration.

De simples modifications permettraient de faire de cet imageur un appareil beaucoup plus intéressant en termes d'informations fournies. En ce moment, une seule longueur d'onde est utilisée pour l'imagerie. Le choix de la diode laser à 690 nm permet uniquement de mesurer les variations d'absorption relatives au chromophore HbR. En ajoutant une seconde longueur d'onde qui corresponde plus au spectre de HbO, il serait possible de réaliser des cartes tridimensionnelles avec les contributions des deux chromophores d'intérêt de l'imagerie optique. On aurait ainsi des informations d'oxygénation encore plus précises pour localiser les foyers d'activation neuronale dans la moelle. Une telle modification ne concerne que le bloc optique car les blocs informatique et électronique ont déjà été conçus

pour alimenter quatre diodes lasers différentes. Utiliser plus de deux longueurs d'onde permettrait d'ailleurs de réduire les erreurs commises lors de l'estimation des concentrations en HbO et HbR.

Cet imageur fonctionne selon la modalité de TOL mais il serait facile de le transformer en imageur multimodal. En ajoutant une photomultiplicatrice contigüe à la matrice de photodiodes à avalanche, ainsi qu'une seconde séparatrice de faisceau suivie d'un filtre dichroïque, il serait possible de mesurer du contraste de fluorescence. Enfin passer le montage à l'horizontale avec un angle à 90° assuré par une dernière séparatrice permettrait l'ajout d'une caméra CCD juste au-dessus de la zone imagée. La division par huit du signal due aux trois séparatrices pourrait être compensée en augmentant la puissance d'illumination de la diode laser.

Un tel appareil délivrerait donc des informations sur le contraste d'absorption, le contraste de fluorescence et aussi des signaux optiques intrinsèques d'une même région en une seule acquisition. La comparaison et l'éventuelle corrélation de ces données entre elles présentent un intérêt certain.

## **O2. Caractériser ses performances et valider sa robustesse en effectuant des acquisitions sur fantômes.**

L'étape de test a été validée par de nombreuses acquisitions effectuées sur des fantômes de natures différentes. En effet, les résultats obtenus et décrits dans le chapitre 4 sont semblables à ceux de Yuan et al. 2009. Ils nous ont permis de vérifier aussi bien les principes physiques de la tomographie optique laminaire que le fonctionnement correct de notre système d'acquisition avec des résultats reproductibles d'une expérience à l'autre. La résolution effective de  $125 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$  pour un champ de vision maximal de  $5,5 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$ , la profondeur d'observation de 2,5 mm, la grande sensibilité des détecteurs mais aussi la robustesse de l'interface graphique développée ainsi que le taux de formation de 7,5 images par seconde nous ont convaincus des performances de cet imageur pour l'imagerie de la moelle épinière du rat. Ces performances peuvent être adaptées à des zones

d'imagerie plus étendues. Pour cela, il est nécessaire de changer certaines distances de travail dans le système optique comme la distance focale de la lentille de scan qui doit être augmentée pour un champ de vision plus grand. De ce fait, il est préférable d'utiliser des lentilles de diamètre 50,8 mm au lieu de 25,4 tout d'abord pour être sûr de ne perdre aucun rayon lumineux et ensuite pour augmenter l'ouverture numérique de l'appareil qui revient à collecter plus d'intensité lumineuse.

### **O3. Effectuer des expériences *in vivo* sur la moelle épinière du rat.**

Dans la dernière phase de ce projet, l'imageur TOL a été utilisé sur deux rats non lésés. Les résultats obtenus ont fait l'objet de l'article présenté au chapitre 5 de ce mémoire. Non seulement ces résultats sont innovants car c'est la première fois que l'activité neuronale de la moelle épinière du rat est imagée grâce à cette technique mais ils constituent une preuve de concept. Grâce à ces deux expériences, de nouvelles pistes d'exploration sont ouvertes pour l'imagerie de la moelle épinière. La TOL semble constituer un outil puissant afin de mieux comprendre les phénomènes subséquents à une lésion de la moelle épinière. Maintenant que la capacité de la TOL à imager la moelle est établie, il est nécessaire de réaliser une étude à grande échelle qui permette de vérifier la stabilité et la reproductibilité des résultats déjà obtenus.

### **O4. Valider les résultats obtenus dans la moelle en corrélant la réponse hémodynamique de la moelle avec celle du cerveau à l'aide de l'imagerie optique intrinsèque.**

La corrélation entre les deux réponses hémodynamiques a été mise en évidence. L'utilisation d'une technique de référence qui a déjà démontré son potentiel telle que l'IOI était nécessaire dans une démarche de validation. Les mêmes changements d'absorption furent observés dans chacune des deux composantes du système nerveux central. Suite à une stimulation, la réponse hémodynamique ipsilatérale dans la moelle imagée à l'aide la

TOL présente la même allure que la réponse contralatérale du cerveau imagée par IOI. Ce dernier résultat a fourni une preuve tangible que le signal récupéré par la TOL correspondait bien à de l'activation neuronale et non pas du simple signal physiologique. La prochaine étape dans cette démarche de validation est l'acquisition de mesures électrophysiologiques qui fournissent une information directe de l'activité fonctionnelle au sein des tissus neuronaux.

#### **O5. Établir et analyser des cartes tridimensionnelles de l'activation neuronale de la totalité de la moelle épinière du rat.**

Les données brutes obtenues avec l'imageur TOL combinées au modèle de propagation de la lumière Monte-Carlo et à l'algorithme de reconstruction dédié à cette tache ont permis d'établir une carte d'activation neuronale en trois dimensions de la région lombaire de la moelle épinière du rat. L'étude de cette carte a montré une activation plus importante en profondeur entre 850 µm et 1650 µm qu'en surface de la moelle. Ce résultat, bien que prévisible étant donné la présence de la matière grise au centre de la moelle, est totalement exclusif. Il a été vu dans le chapitre 1 que des études menées précédemment comme Sasaki et al. 2002 n'ont pu imager que l'activation des interneurones situés entre 300 et 1000 µm. Les résultats obtenus par la TOL semblent indiquer que l'activation des motoneurones puisse être imagée au même titre. La TOL permettrait ainsi de faire la distinction entre l'activation neuronale d'origine sensorielle et l'activation d'origine motrice. Par conséquent, il est très important de confirmer de tels résultats en augmentant le nombre d'animaux étudiés pour voir si une telle carte peut se reproduire sur chaque animal.

Au travers de ces objectifs, les hypothèses de départ ont elles aussi pu être validées. La faisabilité de l'application de la TOL sur la moelle épinière du rat et sa capacité à mesurer la réponse hémodynamique ont bien été montrées. Les cartes d'activation tridimensionnelles construites confirment que l'organisation vasculaire de surface et de

profondeur peuvent être distinguées grâce à cette technique d'imagerie. Pour aboutir, ce projet doit donc franchir de nouvelles étapes importantes.

Comme il a déjà été dit, tous les résultats établis lors de ce travail de maîtrise fournissent une preuve de concept. Il faut maintenant utiliser l'imageur TOL sur un nombre suffisamment important de rats pour comprendre les processus de plasticité neuronale au sein de la moelle. Avant tout, les résultats sur les informations de profondeur doivent être vérifiés. Pour cela, il serait intéressant de reprendre l'expérience de Sasaki et al. 2002. L'utilisation d'un bloqueur synaptique Cd<sup>2+</sup> lors d'une acquisition sur un rat non lésé devrait totalement faire disparaître le signal optique sur chaque détecteur, du moins sur le premier millimètre de moelle qui est sensé contenir les interneurones qui sont les seuls neurones dont l'activation peut être imagée par optique intrinsèque. Or nous avons vu que les signaux en TOL étaient les plus forts entre 850 µm et 1650 µm où il y a aussi des motoneurones présents. Si tout le signal en TOL disparaît lorsqu'on injecte ce bloqueur synaptique, on pourra confirmer que comme Sasaki l'a dit, seule l'activation des interneurones peut être imagée par optique mais cela signifie que les interneurones ne se situent pas uniquement dans la corne postérieure de la moelle épinière. Par contre, si le signal de surface disparaît mais pas celui de profondeur, c'est que l'activation des motoneurones peut aussi être imagée par optique. Cela offrirait des perspectives intéressantes pour établir des cartes d'activation inédites qui fassent la distinction entre l'influx nerveux sensoriel et l'influx nerveux moteur.

Une fois que ces expériences auront été accomplies et ces hypothèses infirmées ou confirmées, l'imageur TOL devrait être utilisé sur des rats lésés afin de comparer les cartes d'activation tridimensionnelles entre les rats lésés ou non.

## CONCLUSION

L'originalité de ce travail de maîtrise réside dans la grande transversalité de ce projet. En effet, plusieurs réalisations dans les domaines de l'optique, de l'électronique et de l'informatique ont été accomplies. L'avantage a été de pouvoir travailler sur le côté expérimental avec l'entièvre conception de l'imageur, le côté théorique relatif à la propagation de la lumière mais aussi et surtout l'analyse des résultats *in vivo* obtenus en abordant directement la problématique clinique qui a motivé la recherche effectuée au cours de ces deux dernières années. L'aspect le plus attrayant est le côté novateur qui présente l'intérêt d'imager une région peu étudiée jusqu'alors, afin d'établir des caractéristiques comparables à celles déjà explicitées par d'autres études dans le cortex.

Ce mémoire confirme que la tomographie optique laminaire déjà utilisée pour le cortex peut aussi s'appliquer dans le cas de la moelle épinière. Les premiers résultats obtenus et décrits dans ce mémoire encouragent à continuer l'étude de la moelle épinière et surtout persévérer dans la compréhension de la réorganisation neuronale après une lésion médullaire. Ce travail soulève d'ores et déjà de nombreuses questions avec des informations inédites qui pourront, nous l'espérons, ouvrir la voie à de nouvelles études afin de découvrir de nouveaux moyens de traitement de ces traumatismes.

## LISTE DE RÉFÉRENCES

- Arridge, S. R., & Hebden, J. C. (1997). Optical imaging in medicine: II. Modelling and reconstruction. *Physics in Medicine and Biology*, 42(5), 841-853.
- Arridge, S. R. (1999). Optical tomography in medical imaging. *Inverse Problems*, 15(2), R41-R93.
- Arthurs, O. J., & Boniface, S. (2002). How well do we understand the neural origins of the fMRI BOLD signal? *Trends in Neurosciences*, 25(1), 27-31.
- Asai, T., Kusudo, K., Ikeda, H., & Murase, K. (2002). Intrinsic optical signals in the dorsal horn of rat spinal cord slices elicited by brief repetitive stimulation. *The European Journal of Neuroscience*, 15(11), 1737-1746.
- Attwell, D., & Iadecola, C. (2002). The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends in Neurosciences*, 25(12), 621-625.
- Bandettini, P. A., Wong, E. C., Hinks, R. S., Tikofsky, R. S., & Hyde, J. S. (1992). Time course EPI of human brain function during task activation. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 25(2), 390-397.
- Basso, D. M., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (1996). Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Experimental Neurology*, 139(2), 244-256. doi: 10.1006/exnr.1996.0098

- Basso, D. M., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (2002). Descending systems contributing to locomotor recovery after mild or moderate spinal cord injury in rats: experimental evidence and a review of literature. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 20(5), 189-218.
- Beaumont, E., Houlé, J. D., Peterson, C. A., & Gardiner, P. F. (2004). Passive exercise and fetal spinal cord transplant both help to restore motoneuronal properties after spinal cord transection in rats. *Muscle & Nerve*, 29(2), 234-242. doi: 10.1002/mus.10539
- Beaumont, E., Kaloustian, S., Rousseau, G., & Cormery, B. (2008). Training improves the electrophysiological properties of lumbar neurons and locomotion after thoracic spinal cord injury in rats. *Neuroscience Research*, 62(3), 147-154. doi: 10.1016/j.neures.2008.07.003
- Belliveau, J. W., Rosen, B. R., Kantor, H. L., Rzedzian, R. R., Kennedy, D. N., McKinstry, R. C., et al. (1990). Functional cerebral imaging by susceptibility-contrast NMR. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 14(3), 538-546.
- Boas, D. A., Gaudette, T., Strangman, G., Cheng, X., Marota, J. J., & Mandeville, J. B. (2001). The accuracy of near infrared spectroscopy and imaging during focal changes in cerebral hemodynamics. *NeuroImage*, 13(1), 76-90. doi: 10.1006/nimg.2000.0674

- Boas, D. A., Dale, A. M., & Franceschini, M. A. (2004). Diffuse optical imaging of brain activation: approaches to optimizing image sensitivity, resolution, and accuracy. *NeuroImage, 23 Suppl 1*, S275-288. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.07.011
- Boas, D. A. (1996). *Diffuse photon probes of structural and dynamical properties of turbid media : Theory and biomedical applications*. University of Pennsylvania.
- Bracken, M. B., Shepard, M. J., Collins, W. F., Holford, T. R., Young, W., Baskin, D. S., et al. (1990). A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *The New England Journal of Medicine, 322*(20), 1405-1411.
- Bracken, M. B., Shepard, M. J., Holford, T. R., Leo-Summers, L., Aldrich, E. F., Fazl, M., et al. (1997). Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA: The Journal of the American Medical Association, 277*(20), 1597-1604.
- Buxton, R. B., & Frank, L. R. (1997). A model for the coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism during neural stimulation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 17*(1), 64-72. doi: 10.1097/00004647-199701000-00009

- Buxton, R. B., Wong, E. C., & Frank, L. R. (1998). Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation: the balloon model. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 39(6), 855-864.
- Buxton, R. B. (2002). *Introduction to Functional Magnetic Resonance Imaging : Principles and Techniques*. Cambridge University Press.
- Buxton, R. B., Uludağ, K., Dubowitz, D. J., & Liu, T. T. (2004). Modeling the hemodynamic response to brain activation. *NeuroImage*, 23 Suppl 1, S220-233. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.07.013
- Cohen-Adad, J., Hoge, R. D., Leblond, H., Xie, G., Beaudoin, G., Song, A. W., et al. (2009). Investigations on spinal cord fMRI of cats under ketamine. *NeuroImage*, 44(2), 328-339. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.09.023
- Dunn, A., & Boas, D. (2000). Transport-based image reconstruction in turbid media with small source?detector separations. *Optics Letters*, 25(24), 1777-1779. doi: 10.1364/OL.25.001777
- Dunn, A. K., Devor, A., Dale, A. M., & Boas, D. A. (2005). Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex. *NeuroImage*, 27(2), 279-290. doi: 10.1016/j.neuroimage.2005.04.024

- Endo, T., Spenger, C., Westman, E., Tominaga, T., & Olson, L. (2008). Reorganization of sensory processing below the level of spinal cord injury as revealed by fMRI. *Experimental Neurology*, 209(1), 155-160. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.09.017
- George, E. R., Scholten, D. J., Buechler, C. M., Jordan-Tibbs, J., Mattice, C., & Albrecht, R. M. (1995). Failure of methylprednisolone to improve the outcome of spinal cord injuries. *The American Surgeon*, 61(8), 659-663; discussion 663-664.
- Giulietti, G., Giove, F., Garreffa, G., Colonnese, C., Mangia, S., & Maraviglia, B. (2008). Characterization of the functional response in the human spinal cord: Impulse-response function and linearity. *NeuroImage*, 42(2), 626-634. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.05.006
- Govers, N., Béghin, J., Van Goethem, J. W. M., Michiels, J., van den Hauwe, L., Vandervliet, E., et al. (2007). Functional MRI of the cervical spinal cord on 1.5 T with fingertapping: to what extent is it feasible? *Neuroradiology*, 49(1), 73-81. doi: 10.1007/s00234-006-0162-4
- Hall, E. D., & Wolf, D. L. (1986). A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanisms of posttraumatic spinal cord ischemia. *Journal of Neurosurgery*, 64(6), 951-961. doi: 10.3171/jns.1986.64.6.0951
- Hebden, J. C., Arridge, S. R., & Delpy, D. T. (1997). Optical imaging in medicine: I. Experimental techniques. *Physics in Medicine and Biology*, 42(5), 825-840.

- Hillman, E. M. C. (2006). Laminar optical tomography: high-resolution 3D functional imaging of superficial tissues. Dans *Proceedings of SPIE* (pp. 61431M-61431M-14). Présenté au Medical Imaging 2006: Physiology, Function, and Structure from Medical Images, San Diego, CA, USA. doi: 10.1117/12.655876
- Hillman, E. M. C., Boas, D. A., Dale, A. M., & Dunn, A. K. (2004). Laminar optical tomography: demonstration of millimeter-scale depth-resolved imaging in turbid media. *Optics Letters*, 29(14), 1650-1652.
- Hillman, E. M. C., Bouchard, M., Devor, A., de Crespigny, A., & Boas, D. A. (2006). Functional optical imaging of brain activation: a multi-scale, multi-modality approach. Dans *Life Science Systems and Applications Workshop, 2006. IEEE/NLM* (pp. 1-2). Présenté au Life Science Systems and Applications Workshop, 2006. IEEE/NLM. doi: 10.1109/LSSA.2006.250368
- Hillman, E. M. C., Devor, A., & Boas, D. A. (2006). High-resolution functional optical imaging of living tissues. Dans *Biomedical Imaging: Nano to Macro, 2006. 3rd IEEE International Symposium on* (pp. 1192-1195). Présenté au Biomedical Imaging: Nano to Macro, 2006. 3rd IEEE International Symposium on. doi: 10.1109/ISBI.2006.1625137
- Hillman, E. M. C., Devor, A., Bouchard, M. B., Dunn, A. K., Krauss, G. W., Skoch, J., et al. (2007). Depth-resolved optical imaging and microscopy of vascular compartment dynamics during somatosensory stimulation. *NeuroImage*, 35(1), 89-104. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.11.032

- Hillman, E. M. C., Bernus, O., Pease, E., Bouchard, M. B., & Pertsov, A. (2007). Depth-resolved optical imaging of transmural electrical propagation in perfused heart. *Optics Express*, 15(26), 17827-17841.
- Hillman, E. M. C., & Burgess, S. A. (2009). Sub-millimeter resolution 3D optical imaging of living tissue using laminar optical tomography. *Laser & Photonics Reviews*, 3(1-2), 159-179. doi: 10.1002/lpor.200810031
- Keilin, D. (1925). On Cytochrome, a Respiratory Pigment, Common to Animals, Yeast, and Higher Plants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 98(690), 312-339. doi: 10.1098/rspb.1925.0039
- Kim, A. D., & Schotland, J. C. (2006). Self-consistent scattering theory for the radiative transport equation. *Journal of the Optical Society of America A*, 23(3), 596-602. doi: 10.1364/JOSAA.23.000596
- Konecky, S. D., Panasyuk, G. Y., Lee, K., Markel, V., Yodh, A. G., & Schotland, J. C. (2008). Imaging complex structures with diffuse light. *Optics Express*, 16(7), 5048-5060. doi: 10.1364/OE.16.005048
- Kwong, K. K., Belliveau, J. W., Chesler, D. A., Goldberg, I. E., Weisskoff, R. M., Poncelet, B. P., et al. (1992). Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), 5675-5679.

- Lawrence, J., Stroman, P. W., Bascaramurty, S., Jordan, L. M., & Malisza, K. L. (2004). Correlation of functional activation in the rat spinal cord with neuronal activation detected by immunohistochemistry. *NeuroImage*, 22(4), 1802-1807. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.04.001
- Lawrence, J., Stroman, P. W., & Malisza, K. L. (2007). Comparison of functional activity in the rat cervical spinal cord during alpha-chloralose and halothane anesthesia. *NeuroImage*, 34(4), 1665-1672. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.08.040
- Lesage, F., Brieu, N., Dubeau, S., & Beaumont, E. (2009). Optical imaging of vascular and metabolic responses in the lumbar spinal cord after T10 transection in rats. *Neuroscience Letters*, 454(1), 105-109. doi: 10.1016/j.neulet.2009.02.060
- Lilja, J., Endo, T., Hofstetter, C., Westman, E., Young, J., Olson, L., et al. (2006). Blood oxygenation level-dependent visualization of synaptic relay stations of sensory pathways along the neuroaxis in response to graded sensory stimulation of a limb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(23), 6330-6336. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0626-06.2006
- Logothetis, N. K. (2002). The neural basis of the blood-oxygen-level-dependent functional magnetic resonance imaging signal. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1424), 1003-1037. doi: 10.1098/rstb.2002.1114
- Madi, S., Flanders, A. E., Vinitski, S., Herbison, G. J., & Nissanov, J. (2001). Functional MR Imaging of the Human Cervical Spinal Cord. *AJNR Am J Neuroradiol*, 22(9), 1768-1774.

- Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (1997). Metabolic coupling during activation. A cellular view. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 413, 161-166.
- Magnuson, D. S., Trinder, T. C., Zhang, Y. P., Burke, D., Morassutti, D. J., & Shields, C. B. (1999). Comparing deficits following excitotoxic and contusion injuries in the thoracic and lumbar spinal cord of the adult rat. *Experimental Neurology*, 156(1), 191-204. doi: 10.1006/exnr.1999.7016
- Maier, M., Iannetti, G. D., Bodurka, J., Tracey, I., Bandettini, P. A., & Porro, C. A. (2007). Functional responses in the human spinal cord during willed motor actions: evidence for side- and rate-dependent activity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(15), 4182-4190. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3910-06.2007
- Majcher, K., Tomanek, B., Tuor, U. I., Jasinski, A., Foniok, T., Rushforth, D., et al. (2007). Functional magnetic resonance imaging within the rat spinal cord following peripheral nerve injury. *NeuroImage*, 38(4), 669-676. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.08.010
- Malisza, K. L., Stroman, P. W., Turner, A., Gregorash, L., Foniok, T., & Wright, A. (2003). Functional MRI of the rat lumbar spinal cord involving painful stimulation and the effect of peripheral joint mobilization. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, 18(2), 152-159. doi: 10.1002/jmri.10339
- Mendell, L. M. (1984). Modifiability of spinal synapses. *Physiological Reviews*, 64(1), 260-324.

- Mihai, G., Nout, Y. S., Tovar, C. A., Miller, B. A., Schmalbrock, P., Bresnahan, J. C., et al. (2008). Longitudinal comparison of two severities of unilateral cervical spinal cord injury using magnetic resonance imaging in rats. *Journal of Neurotrauma*, 25(1), 1-18. doi: 10.1089/neu.2007.0338
- Millikan, G. A. (1937). Experiments on Muscle Haemoglobin in vivo; The Instantaneous Measurement of Muscle Metabolism. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 123(831), 218-241.
- Nix, W., Capra, N., Erdmann, W., & Halsey, J. (1976). Comparison of vascular reactivity in spinal cord and brain. *Stroke*, 7(6), 560-563.
- Ogawa, S., Lee, T. M., Kay, A. R., & Tank, D. W. (1990). Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24), 9868-9872.
- Ogawa, S., Lee, T. M., Nayak, A. S., & Glynn, P. (1990). Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 14(1), 68-78.
- Ogawa, S., Tank, D. W., Menon, R., Ellermann, J. M., Kim, S. G., Merkle, H., et al. (1992). Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), 5951-5955.
- Prince, J. L., & Links, J. (2006). *Medical Imaging Signals and Systems*. Pearson Prentice Hall.

- Raichle, M. E. (2001). Inaugural Article: A default mode of brain function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(2), 676-682. doi: 10.1073/pnas.98.2.676
- Raichle, M. E. (2006). Neuroscience. The brain's dark energy. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5803), 1249-1250. doi: 10.1126/science.1134405
- Raichle, M. E., & Mintun, M. A. (2006). Brain work and brain imaging. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 449-476. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112819
- Roy, C. S., & Sherrington, C. S. (1890). On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *The Journal of Physiology*, 11(1-2), 85-158.17.
- Sasaki, S., Sato, K., Shinomiya, K., & Momose-Sato, Y. (2003). Postnatal changes in intrinsic optical responses to peripheral nerve stimulation in the in vivo rat spinal cord. *NeuroImage*, 20(4), 2126-2134.
- Sasaki, S., Yazawa, I., Miyakawa, N., Mochida, H., Shinomiya, K., Kamino, K., et al. (2002). Optical imaging of intrinsic signals induced by peripheral nerve stimulation in the in vivo rat spinal cord. *NeuroImage*, 17(3), 1240-1255.
- Schucht, P., Raineteau, O., Schwab, M. E., & Fouad, K. (2002). Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord. *Experimental Neurology*, 176(1), 143-153.
- Schweiger, M., Gibson, A., & Arridge, S. (2003). Computational aspects of diffuse optical tomography. *Computing in Science & Engineering*, 5(6), 33-41. doi: 10.1109/MCISE.2003.1238702
- Shulman, R. G., Hyder, F., & Rothman, D. L. (2002). Biophysical basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(3), 287-325.

- SPINALCORD: Facts & Figures at a Glance. <http://www.spinalcord.uab.edu.de>
- <http://www.spinalcord.uab.edu/show.asp?durki=119513>
- Stroman, P. W., Kornelsen, J., Bergman, A., Krause, V., Ethans, K., Malisza, K. L., et al. (2004). Noninvasive assessment of the injured human spinal cord by means of functional magnetic resonance imaging. *Spinal Cord: The Official Journal of the International Medical Society of Paraplegia*, 42(2), 59-66. doi: 10.1038/sj.sc.3101559
- Stroman, P. W., Krause, V., Malisza, K. L., Frankenstein, U. N., & Tomanek, B. (2002a). Extravascular proton-density changes as a non-BOLD component of contrast in fMRI of the human spinal cord. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 48(1), 122-127. doi: 10.1002/mrm.10178
- Stroman, P. W., Krause, V., Malisza, K. L., Frankenstein, U. N., & Tomanek, B. (2002b). Extravascular proton-density changes as a non-BOLD component of contrast in fMRI of the human spinal cord. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 48(1), 122-127. doi: 10.1002/mrm.10178
- Stroman, P. W., & Ryner, L. N. (2001). Functional MRI of motor and sensory activation in the human spinal cord. *Magnetic Resonance Imaging*, 19(1), 27-32.

- Stroman, P. W., Tomanek, B., Krause, V., Frankenstein, U. N., & Malisza, K. L. (2003). Functional magnetic resonance imaging of the human brain based on signal enhancement by extravascular protons (SEEP fMRI). *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 49(3), 433-439. doi: 10.1002/mrm.10831
- Stroman, P. W., Kornelsen, J., Lawrence, J., & Malisza, K. L. (2005). Functional magnetic resonance imaging based on SEEP contrast: response function and anatomical specificity. *Magnetic Resonance Imaging*, 23(8), 843-850. doi: 10.1016/j.mri.2005.07.009
- Toda, N., & Okamura, T. (1993). Cerebral vasoconstrictor mediators. *Pharmacology & Therapeutics*, 57(2-3), 359-375.
- Uğurbil, K., Toth, L., & Kim, D. S. (2003). How accurate is magnetic resonance imaging of brain function? *Trends in Neurosciences*, 26(2), 108-114.
- Valabrege, R. (2003). *Modélisation des relations entre l'activité neuronale et le signal BOLD en IRM*. Paris VI Pierre et Marie Curie, UFR des sciences de la vie, Biophysique.
- Valero-Cabré, A., Forés, J., & Navarro, X. (2004). Reorganization of reflex responses mediated by different afferent sensory fibers after spinal cord transection. *Journal of Neurophysiology*, 91(6), 2838-2848. doi: 10.1152/jn.01177.2003
- Vogel, C. R. (2009). *Computational Methods for Inverse Problems*. Society for Industrial and App.

- Wang, L. W., & Wu, H. (2007). *Biomedical Optics : Principles and Imaging*. Wiley-Interscience.
- Waters, R. L., Meyer, P. R., Adkins, R. H., & Felton, D. (1999). Emergency, acute, and surgical management of spine trauma. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 80(11), 1383-1390.
- Weber, T., Vroemen, M., Behr, V., Neuberger, T., Jakob, P., Haase, A., et al. (2006). In vivo high-resolution MR imaging of neuropathologic changes in the injured rat spinal cord. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 27(3), 598-604.
- Widmaier, E. P., Raff, H., & Strang, K. T. (2004). *Vander, Sherman, & Luciano's human physiology : the mechanisms of body function*. (9 éd.). New York: McGraw-Hill Higher Education.
- Willis, W. D., & Coggeshall, R. E. (1991). *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord* (2 éd.).
- Yoshizawa, T., Nose, T., Moore, G. J., & Sillerud, L. O. (1996). Functional magnetic resonance imaging of motor activation in the human cervical spinal cord. *NeuroImage*, 4(3 Pt 1), 174-182. doi: 10.1006/nimg.1996.0068
- Yuan, B., Burgess, S. A., Iranmahboob, A., Bouchard, M. B., Lehrer, N., Bordier, C., et al. (2009). A system for high-resolution depth-resolved optical imaging of fluorescence and absorption contrast. *The Review of Scientific Instruments*, 80(4), 043706. doi: 10.1063/1.3117204

Zhao, F., Williams, M., Meng, X., Welsh, D. C., Coimbra, A., Crown, E. D., et al. (2008). BOLD and blood volume-weighted fMRI of rat lumbar spinal cord during non-noxious and noxious electrical hindpaw stimulation. *NeuroImage*, 40(1), 133-147.  
doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.11.010

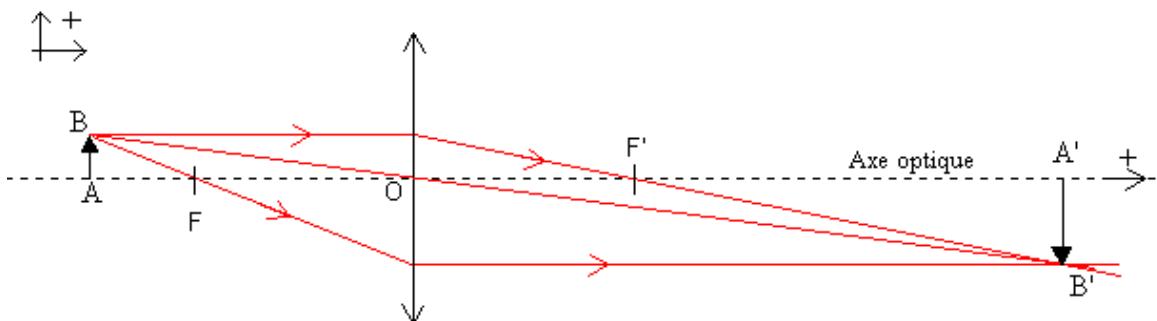
## ANNEXE 1 – Bases d'optique géométrique

Règles d'optique géométrique dans le cas d'une lentille mince convergente:

Une lentille mince convergente est composée de deux dioptres. Elle est caractérisée par sa distance focale  $f$  ainsi que ses foyers objet et image respectivement  $F$  et  $F'$  qui se situent sur l'axe optique de part et d'autre de la lentille séparés du centre de celle-ci par la distance  $f$ . Les règles de construction des rayons lumineux la traversant sont les suivantes :

- tout rayon passant par le centre de la lentille  $O$  n'est pas dévié par celle-ci,
- tout rayon incident parallèle à l'axe optique ressort de la lentille en passant par son foyer image  $F'$ ,
- tout rayon incident passant par le foyer objet de la lentille ressort parallèle à l'axe optique.

La figure suivante qui illustre une lentille convergente reformant l'image  $A'B'$  d'un objet  $AB$  donne un aperçu visuel des règles énoncées précédemment :



**Figure I.1:** Constructions de rayons lumineux pour une lentille mince convergente.

La taille de l'objet  $A'B'$  ainsi que sa localisation sont données par les relations de conjugaison de Descartes et de Newton. On travaille avec des distances algébriques suivant l'axe optique.

Relation de Descartes avec origine au centre de la lentille :

$$\text{Localisation de } A' : \quad \frac{1}{\overline{OA'}} - \frac{1}{\overline{OA}} = \frac{1}{\overline{OF'}} \quad \text{I.1}$$

$$\text{Grandissement :} \quad \gamma = \left| \frac{\overline{OA'}}{\overline{OA}} \right| = \left| \frac{\overline{A'B'}}{\overline{AB}} \right| \quad \text{I.2}$$

Relation de Newton avec origine aux foyers de la lentille :

$$\text{Localisation de } A' : \quad \overline{F'A'} \bullet \overline{FA} = -f'^2 \quad \text{I.3}$$

Telles que :

$$\begin{aligned} \overline{OF} &= f \\ \overline{OF'} &= f' \\ f &= -f' \end{aligned} \quad \text{I.4}$$

Selon le cas, on parle d'objet réel ou virtuel, et d'image réelle ou virtuelle en considérant la direction de propagation de la lumière (norme de la gauche vers la droite).

On dit d'un objet qu'il est réel s'il se trouve situé avant le centre optique  $O$ , deux cas sont alors possibles concernant son image :

- si l'objet se trouve avant le foyer objet  $F$ , alors son image sera réelle i.e. après le centre optique de la lentille,
- si l'objet se trouve entre le foyer objet  $F$  et le centre optique  $O$ , son image sera virtuelle i.e. avant le centre optique de la lentille.

Un objet est dit virtuel, s'il se trouve après le centre optique de la lentille, là aussi on distingue deux cas différents :

- si l'objet se trouve après le foyer image  $F'$ , alors son image sera virtuelle i.e. avant le centre optique de la lentille et donc du côté opposé à l'objet virtuel,
- si l'objet se trouve entre le foyer image  $F'$  et le centre optique  $O$ , son image sera réelle i.e. après le centre optique de la lentille et donc du même côté que l'objet virtuel.

Un objet réel situé sur l'axe optique à une distance infinie de la lentille se modélise par un faisceau de rayons incidents parallèles à l'axe optique. Par conséquent, son image est réelle et elle est conjuguée en un seul point qui est le foyer image  $F'$ .

Un objet réel situé hors de l'axe optique à une distance infinie de la lentille se modélise par un faisceau de rayons incidents parallèles entre eux mais décrivant un angle  $\theta$  avec l'axe optique. Son image est réelle et elle est formée dans le plan focal image de la lentille défini par le plan orthogonal à l'axe optique contenant le point  $F'$ . La taille de cet objet est donnée par :

$$\text{taille} = f' \tan(2\theta). \quad \text{I.5}$$

Un objet virtuel situé sur l'axe optique à une distance infinie de la lentille possède une image réelle qui se forme dans ce même plan focal image.

## ANNEXE 2 – Description de la théorie probabiliste de la méthode Monte-Carlo

L'espérance mathématique d'une fonction  $g$  de variable aléatoire  $X$  est connue, résultant du théorème de transfert, selon lequel :

$$G = E(g(X)) = \int_a^b g(x) f_X(x) dx \quad \text{II.1}$$

où  $f_X$  est une fonction de densité sur le support  $[a;b]$ . Il est fréquent de prendre une distribution uniforme sur  $[a;b]$ :

$$f_X(x) = \frac{1}{b-a}. \quad \text{II.2}$$

Ceci peut être étendu aux probabilités discrètes en sommant grâce à une mesure  $\nu$  discrète, de type Dirac.

L'idée est de produire un échantillon  $(x_1, x_2, \dots, x_N)$  de la loi  $X$  (donc d'après la densité  $f_X$ ) sur le support  $[a;b]$ , et de calculer un nouvel estimateur dit de Monte-Carlo, à partir de cet échantillon.

La loi des grands nombres suggère de construire cet estimateur à partir de la moyenne empirique :

$$\hat{g}_N = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N g(x_i). \quad \text{II.3}$$

Cet estimateur sans biais de l'espérance est l'estimateur de Monte-Carlo. En remplaçant l'échantillon par un ensemble de valeurs prises dans le support d'une intégrale, et de la fonction à intégrer, il est possible de construire statistiquement une approximation de sa valeur.

Cette estimation est sans biais, dans le sens où :

$$E(\hat{g}_N) = G = E(g(X)). \quad \text{II.4}$$

Il faut quantifier la précision de cette estimation, via la variance de l'estimateur de Monte-Carlo. Si l'échantillon est supposé indépendant et identiquement distribué, cette variance est estimée à l'aide de la variance empirique :

$$S_{g(X)}^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (g(x_i) - \hat{g}_N)^2 \approx \sigma_g^2 \quad \text{II.5}$$

avec

$$\sigma_g^2 = E(g^2(X)) - E(g(X))^2 = \int_{\Omega} g^2(x) f_X(x) dx - G^2. \quad \text{II.6}$$

Par le théorème de la limite centrale, la variable

$$Z := \frac{\hat{g}_N - G}{\sigma_g / \sqrt{N}} \equiv \sqrt{N} \left( \frac{\hat{g}_N - G}{\sigma_g} \right) \quad \text{II.7}$$

qui est centrée et réduite, suit approximativement la loi normale centrée réduite, i.e. loi de Gauss. Il est alors possible de construire des intervalles de confiance, ce qui permet d'encadrer l'erreur commise en remplaçant  $G$  par l'estimateur de Monte-Carlo. Si cette erreur est dénotée  $e_n$ , alors pour un niveau de risque  $\alpha$  donné, on a:

$$|e_n| \leq z_{\alpha/2} \frac{\sigma_g}{\sqrt{N}} \quad \text{II.8}$$

avec la probabilité  $1 - \alpha$ . Le réel  $z_{\alpha/2}$  est le quantile de la loi de Gauss.