

Titre: Histologie sérielle afin d'étudier les changements de
Title: microvasculature dans la maladie d'Alzheimer

Auteur: Patrick Delafontaine-Martel
Author:

Date: 2018

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Delafontaine-Martel, P. (2018). Histologie sérielle afin d'étudier les changements
Citation: de microvasculature dans la maladie d'Alzheimer [Master's thesis, École
Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/3093/>

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/3093/>
PolyPublie URL:

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

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

HISTOLOGIE SÉRIELLE AFIN D'ÉTUDIER LES CHANGEMENTS DE
MICROVASCULATURE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

PATRICK DELAFONTAINE-MARTEL
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

AVRIL 2018

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

HISTOLOGIE SÉRIELLE AFIN D'ÉTUDIER LES CHANGEMENTS DE
MICROVASCULATURE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

présenté par : DELAFONTAINE-MARTEL Patrick

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

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

Mme CHERIET Farida, Ph. D., présidente

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

M. LEBLOND Frédéric, Ph. D., membre

DÉDICACE

*“Cut my legs off but don't take away my ability to think,
dream, and write”*

- Thomas DeBaggio, Losing My Mind

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier, en premier lieu, mon directeur de recherche Frédéric Lesage qui m'a offert cette opportunité de m'initier au monde de la recherche et me permettre de réaliser ce projet sur lequel j'ai étudié durant ces deux dernières années. Sa disponibilité à répondre à mes questions m'a grandement aidé dans ce périple et son esprit d'organisation est un modèle sur lequel j'aspire reproduire. Ayant financé mon projet, je lui dois beaucoup et c'est avec un grand plaisir que je poursuivrai mes études au doctorat sous sa direction pour mettre à terme le système d'imagerie initialement proposé et pour élargir mes compétences en montage de système informatique et optique.

Je désire offrir une mention spéciale à mes collègues du laboratoire. Tout d'abord, une mention spéciale est dirigée vers Joël Lefebvre qui avec son humour discret n'a jamais cessé de me faire rire et m'a souvent remonté le moral durant les derniers moments de la maîtrise. De plus, ses compétences informatiques hors pair m'ont grandement aidé lors de moments difficiles dans mon apprentissage d'Ubuntu et de Python dans le cadre de ma maîtrise. Aussi à Samuel Bélanger et Maxime Abran pour leurs conseils au niveau des montages optiques et électriques qui ont permis la mise en marche du système d'imagerie que j'ai utilisé. Je remercie aussi tous les autres membres de LIOM pour les moments loufoques et les discussions qui ne rataient jamais l'occasion de me faire rire ou de me renseigner sur différents domaines.

Je veux aussi remercier mon père Michel Martel, ma mère Guylaine Delafontaine ainsi que ma sœur Mylène Delafontaine-Martel de m'avoir soutenu au cours de mes années aux cycles supérieurs et qui m'ont apporté la force de me surpasser. Je désire remercier mes amis avec qui j'ai développé mon imagination et mes talents d'improvisation pour nos soirées de jeux de rôle.

Enfin, un remerciement tout à fait spécial va à la personne qui a su par-dessus tout me faire sentir aimé et avec qui je partage déjà plus de 5 ans de ma vie. Tu as été celle avec qui j'ai pu me reposer et passer mes plus beaux moments.

Élissa Malo, je t'aime.

RÉSUMÉ

Plusieurs découvertes en médecine, biologie et chimie sont dues aux techniques d'imagerie microscopique en développement constant afin d'observer le monde trop petit pour l'œil humain. L'imagerie *ex vivo* est devenue un outil de choix pour observer et caractériser les effets de différentes pathologies sur les organes biologiques affectés. Depuis la fabrication du premier microscope par Hans Janssen en 1590, les méthodes d'imagerie n'ont pas cessé de s'améliorer pour répondre à des questions plus spécifiques.

Les techniques d'imagerie sous microscope se distinguent par leur haute résolution, leur capacité à nous informer sur la structure biologique et, pour certaines formes d'imagerie, sur la composition moléculaire de l'échantillon. En couplant un système d'imagerie conventionnel avec un vibratome et un stage mécanique, il nous est possible d'effectuer de l'imagerie en face sur bloc. Cette technique consiste à imager la surface d'un échantillon et, suite à l'acquisition, la retirer du champ de vue du microscope en coupant la surface de l'échantillon à une épaisseur choisie, permettant ainsi d'imager la totalité de l'échantillon et d'effectuer sa reconstruction en 3 dimensions. Cette méthode d'imagerie, appelée imagerie tomographique sérielle, est compatible avec la microscopie deux-photons et nous permet d'imager en profondeur dans les tissus en réduisant ainsi le nombre de coupes nécessaires pour l'imagerie complète de l'échantillon. En microscopie deux-photons, la longueur d'onde de la lumière utilisée est plus grande que la lumière visible. Ainsi, la longueur de pénétration de la lumière s'en voit améliorée et la résolution axiale du système d'imagerie est intrinsèquement meilleure que la fluorescence conventionnelle. Ce style d'imagerie est donc naturellement compatible avec un vibratome tout en conservant un niveau de signal à bruit élevé. En utilisant des miroirs galvanométriques, un balayage de la surface de l'échantillon est effectué afin de réaliser une image. Cette technique permet d'utiliser des sources de contraste comme des fluorophores ou un contraste intrinsèque tel que le collagène.

Dans ce travail, nous avons développé un système combinant la microscopie deux-photons et un vibratome afin d'observer la densité vasculaire dans des cerveaux perfusés avec de la gélatine mélangée au fluorophore FITC. Cette technique nous permet la caractérisation et l'imagerie des capillaires ou de vaisseaux sanguins plus grands dans différentes régions du cerveau. Couplant cette méthode avec une coregistration à un atlas du cerveau de souris disponible publiquement

(Allen Brain Atlas), nous pouvons segmenter automatiquement les régions d'intérêt de nos données, cartographier les changements de densité vasculaire et comparer des groupes d'échantillons. L'hypothèse posée dans ce travail est que des changements au niveau de la microvasculature sanguine s'opèrent dans différentes régions d'intérêt durant le développement de la maladie d'Alzheimer. Utilisant le microscope sériel conçu dans ce mémoire, muni d'un objectif 4x procurant une résolution de $2 \times 2 \times 50 \text{ um}^3$ et un champ de vue de $1500 \times 1500 \text{ um}^2$, il est possible d'imager un cerveau murin complet en l'espace de 3 jours en effectuant des coupes de 200 um par le vibratome.

Nous avons comparé les cerveaux murins de 3 groupes d'âge (2, 4.5 et 8 mois) de souris transgéniques APP/PS1 développant des symptômes semblables à la maladie d'Alzheimer et des souris de type sauvage comme contrôle. Pour cette recherche, nous nous sommes concentrés sur des régions du cerveau ayant des fonctions dans la consolidation et la mémoire telles que les hippocampes et le cortex médial préfrontal. Dans toutes ces régions, nous observons une baisse de la densité de vaisseaux sanguins corrélant avec le processus de vieillissement des souris. Cependant, suite à la création d'atlas de densité vasculaire locale comprenant un volume de $200 \times 200 \times 200 \text{ um}^3$ et en utilisant un outil statistique paramétrique, nous observons une tendance de densité vasculaire plus grande lors de la comparaison entre les souris transgéniques et les souris contrôles dans les zones somatosensorielles et motrices du cortex ainsi que dans le bulbe olfactif. Ces données sont très intéressantes malgré qu'elles ne soient pas localisées aux endroits associés à la mémoire, car elles permettent une meilleure compréhension du développement de la maladie dans le modèle murin APP/PS1.

ABSTRACT

Many discoveries in medicine, biology and chemistry are due to ever-developing methods for imaging the small particles in our world. As examples, ex-vivo microscopic imaging has been shown to be an excellent tool to observe and characterize the effects of pathologies on organs. Since the fabrication of the first microscope by Hans Janssen in 1590, improved imaging techniques emerged to answer more specific questions.

Microscopic imaging techniques distinguish themselves by the capacity of informing us on structure, their high resolution and even, for some techniques, the molecular composition. By coupling a common imaging system with a vibratome and a mechanical stage, we can enable 3D imaging of whole biological samples by sequentially removing acquired slices to reveal the tissue beneath it. Called block-face imaging, this method allows for whole organ high-resolution 3D imaging using conventional microscopy techniques, in spite of the limited penetration depth of light in biological tissues. Two-photon microscopy is a non-linear process that has advantages in tissue imaging. Since the wavelength of the used laser is longer, light penetrates deeper into the organs to image what is beneath the surface. In two-photon microscopy, the point spread function (PSF) of the instrument is much smaller than a conventional fluorescent microscope while keeping a high signal to noise ratio making the whole system compatible with a vibratome which is needed to perform 3D imaging. Using scanning mirrors to complete a whole 2D image, one can generate a fluorescence signal from molecular probes and other tissue constituents such as collagen.

The main goal of this research was to develop a high-throughput histology apparatus combining a vibratome and a two-photon fluorescence microscope to perform complete scans of FITC perfused brains. Using two-photon microscopy with FITC labelling gives the opportunity to observe and characterize the microvasculature in different regions of the brain. Coupling this imaging technique with coregistration techniques and a publicly available mouse brain atlas (Allen Brain Atlas), one can extract different cerebellar regions and create maps of vascular density within these brain areas for healthy and sick mouse groups. Our main hypothesis was that vascular density in regions of interest in the brain is affected by the Alzheimer's disease. Using a microscope with a 4x objective giving the system a resolution of $2 \times 2 \times 50$ microns and a field of view of 1500 microns, it was possible to completely scan a brain in three days by making vibratome slices of 200 microns.

Considering the viability and repeatability of the imaging process, we investigated vascular density inside the brains of 3 age groups (2, 4.5 and 8 months) of APP/PS1 transgenic mice developing Alzheimer's disease-related syndromes compared to Wild-Type model as a control. For this research, we focused on regions in the brain processing memory and consolidation such as the hippocampal complex and the medial prefrontal cortex. In these regions, we report a loss of vascular density probably caused by the ageing process. Moreover, following the creation of vascular templates for each brain considering local density in a volume of $200 \times 200 \times 200 \text{ } \mu\text{m}^3$ and using the SPM toolbox, a comparison between the transgenic mice and the WTs shows a tendency of increasing vascular density in the somatomotor and somatosensory cortical regions as well as the olfactory bulb. While not located in memory associated areas, our results give clues on the development of the Alzheimer's disease in APP/PS1 rodent model.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	6
2.1 La maladie d’Alzheimer.....	6
2.1.1 Mécanismes de la maladie	6
2.1.2 Modèle transgénique murin.....	9
2.2 Microscopie tomographique sérielle	9
2.3 Microscopie deux-photons	11
2.3.1 Théorie	11
2.4 Méthodes de segmentation	18
2.4.1 Méthode d’extraction des vaisseaux sanguins	20
2.5 Atlas de cerveau murin.....	21
2.5.1 Outil de normalisation avancé.....	22
2.5.2 Étude statistique	23
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE.....	26
3.1 Microscope à fluorescence deux-photons	26
3.1.1 Caractérisation du microscope	32

3.2	Préparation des échantillons.....	37
3.2.1	Échantillons murins.....	38
3.2.2	Perfusion des échantillons et protocole.....	38
3.2.3	Préparations des échantillons pour fin d'imagerie sérielle	39
3.3	Design du vibratome	40
3.4	Traitement des données	45
3.4.1	Reconstruction pour histologie grand-champs.....	45
3.4.2	Segmentation des vaisseaux sanguins	47
3.4.3	Segmentation des régions d'intérêt	50
3.4.4	Utilisation du programme SPM	52
CHAPITRE 4 ARTICLE 1: WHOLE BRAIN VASCULAR IMAGING IN A MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE WITH TWO-PHOTON MICROSCOPY.....		53
4.1	Introduction	54
4.2	Materials and methods	55
4.2.1	Mice groups.....	55
4.2.2	Brain perfusion and fixation.....	56
4.2.3	Imaging sytem.....	56
4.2.4	Characterisation of the imaging system	58
4.2.5	Image reconstruction.....	58
4.2.6	Coregistration method and vascular template constructionc.....	58
4.2.7	Vessels extraction and volume computation.....	59
4.2.8	Local density template comparison.....	59
4.2.9	MRI Data for comparison	60
4.2.10	MRI data analysis.....	60
4.3	Results	61

4.3.1	Optical system characterization	61
4.3.2	Raw data coregistration and image segmentation	62
4.3.3	Voxel-wise SPM analysis	65
4.3.4	ROI analysis	65
4.4	Discussion	67
4.5	Conclusion.....	68
4.6	References	69
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE		74
5.1	Objectif 1	74
5.2	Objectif 2.....	75
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		77
BIBLIOGRAPHIE		78

LISTE DES FIGURES

Figure 0.1 : Processus d'imagerie sérielle.....	3
Figure 2.1: Changements morphologiques du système sanguin	7
Figure 2.2 : Schématisation de la microscopie tomographique sérielle	10
Figure 2.3 : Modèle atomique pour l'absorption deux-photons.....	11
Figure 2.4 : Différence entre la PSF en fluorescence et en microscopie deux-photons.....	13
Figure 2.5 : Ceinture du faisceau lumineux	14
Figure 2.6 : Configuration pour l'intégrale de Kirchhoff.....	15
Figure 2.7 : Différence de PSF entre confocal et un microscope conventionnel	17
Figure 2.8 : Transformations affines	22
Figure 3.1 : Compensation de la dispersion.	27
Figure 3.2 : Correction de l'angle des miroirs galvanométriques	29
Figure 3.3 : Voltage envoyé aux galvos	30
Figure 3.4 : Plateforme de déplacement.....	31
Figure 3.5 : Schéma du montage	32
Figure 3.6 : Équation transcendante pour l'équation 3.5	33
Figure 3.7 : Résolution latérale	35
Figure 3.8 : Caractérisation de la PSF dans l'axe optique	36
Figure 3.9 : Modélisation Zemax	37
Figure 3.10: Perfusion des échantillons	39
Figure 3.11 : Module de fixation de l'échantillon dans l'agarose.....	40
Figure 3.12 : Parties du vibratome	41
Figure 3.13 : Schéma d'acquisition.....	43
Figure 3.14 : Détection du plan de coupe.....	44

Figure 3.15 : Méthode d'assemblage	46
Figure 3.16 : Comparaison des techniques de segmentation	48
Figure 3.17 : Diagramme de traitement des images.....	50
Figure 3.18 : Processus de coregistration.....	51
Figure 4.1 : Overview of the serial two-photon microscope.....	57
Figure 4.2 : ESF profile.....	61
Figure 4.3: Representative 250µm MIP from one mouse	62
Figure 4.4 : Illustration of the Allen template	63
Figure 4.5: Visualization of the segmentation algorithm.....	64
Figure 4.6 : Sagittal view of the Allen template	65
Figure 4.7: Vascular density for each group and ROI.....	66

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A β	Amyloïde Béta
APP	Protéine Précurseur d'Amyloïde
AD	Maladie d'Alzheimer
fMRI	Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
PBS	Solution tampon de Phosphate
PMT	Tube PhotoMultiplieur
PSF	Fonction de réponse
ROI	Région(s) d'Intérêt
SNR	Ratio signal sur bruit

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Introduction

1.1.1 La maladie d'Alzheimer

Avec l'amélioration des conditions de vie causant le phénomène du vieillissement de la population, plusieurs maladies et symptômes, autrefois méconnus, attirent l'attention dans les pays développés. Parmi les maladies dont la prévalence augmente figure la neurodégénérescence causée par la maladie d'Alzheimer (AD). La maladie fut initialement découverte par un psychiatre neuropathologiste allemand en 1907, Aloïs Alzheimer, qui étudia le cas d'une patiente de 51 ans souffrant de démence. Suite à la mort de sa patiente, il effectua une autopsie pour identifier deux particularités de cette condition : des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires.

Les démences cognitives atteignent une population mondiale grandissante d'environ 47,5 millions en 2015 dont 60 à 70 % des cas sont causés par l'AD ("Fondation pour la recherche médicale"). Cette démence caractérisée par une perte de mémoire, des changements dans le comportement, une perte d'orientation et une difficulté à effectuer des tâches quotidiennes est souvent vécue de façon douloureuse par les proches. D'un point de vue économique, en 2016, le système de santé canadien a dû déboursier plus de 10,4 milliards pour les soins prodigués aux patients atteints de la maladie ("Statistique de la maladie d'Alzheimer au Canada"). Il est alors important de comprendre comment les mécanismes de cette maladie opèrent afin de poser des diagnostics précoces et permettre une augmentation de la longévité saine de vie.

Majoritairement, les études sur les maladies se font, d'un point de vue clinique, sur des patients atteints de la maladie étudiée ou sur des modèles animaux. Si l'étude vise à étudier plutôt les caractères biochimiques d'une maladie, l'utilisation d'échantillons *in vitro* est prescrite et si l'évaluation de changements morphologiques suite à une maladie est recherchée, l'utilisation d'échantillons *ex vivo* ou *in vivo* est désirée. Dans le cas de l'AD, suite à des découvertes au niveau du génome pour des branches de maladies familiales, il est possible d'insérer le gène précurseur de la protéine d'amyloïde (APP) ainsi que des versions mutantes du gène (PS1, PS2, etc.) au niveau

du code génétique de souris pour en créer des modèles d'AD sujets aux dépôts de plaques amyloïdes beta (Quon, 1991), observation connue du développement de l'AD.

Sachant que certains des facteurs de risques de l'AD sont intimement reliés au système cardiovasculaire tels que l'athérosclérose, hypertension, hypotension, arythmie cardiaque et des épisodes de thrombose, il est possible d'émettre l'hypothèse que l'AD serait en partie modulée par le système vasculaire sanguin (De La Torre, 2004). Dans cette optique, la recherche des changements du système sanguin dans le cadre de l'AD a montré des augmentations de densité vasculaire circonscrites spatialement dans une étude (Cifuentes et al., 2015). Cependant, les observations sont limitées à des régions d'intérêt restreintes par les techniques d'imagerie. En effet, la microscopie conventionnelle peut être très coûteuse en temps causant un obstacle de taille pour l'observation de grande surface histologique.

1.1.2 L'histologie sérielle

La plupart des systèmes microscopiques ne permettent pas d'imager la totalité de l'échantillon pouvant ainsi occasionner des difficultés lors d'observation de grandes structures histologiques. Alors, une nouvelle méthode fut développée afin de combiner la haute résolution de ces systèmes en effectuant un grand champ de vue de façon virtuelle. En effet, la numérisation des données, qui consiste à évaluer la valeur d'un pixel pour sa valeur de contraste (Pantanowitz, 2010), a permis de relier les images acquises entre elles afin de voir l'ensemble de la surface imagée comme une seule image. Ce processus de numérisation fut utilisé pour la création du *Big Brain initiative* (Amunts et al., 2013). Combinant 7404 tranches ayant 20 μm d'épaisseur, la reconstruction complète d'un cerveau d'une femme de 65 ans sans antécédents médicaux fut complétée. Le travail de coupe effectué par une main-d'œuvre qualifiée utilisa la paraffine comme moyen de fixation et utilisa un microtome afin de bien contrôler l'épaisseur des tranches du cerveau. Ce travail titanesque prit plus de 1000 heures sans interruption pour l'acquisition complète de l'organe. Cependant, afin d'imager l'échantillon dans sa totalité, le prix à payer est souvent la présence de plusieurs déformations au niveau des coupes. Que ce soit des tensions causées par la lame, des torsions mécaniques lors de la manipulation des tranches ou de déformations liées aux produits chimiques utilisés pour fixer les tissus, on doit considérer ces transformations afin de bien localiser les différentes parties et permettre aux chercheurs de comparer efficacement les régions imagées dans une étude nécessitant

plusieurs individus. Pour surmonter certaines de ces difficultés, il est possible de combiner un trancheur automatique à l'intérieur de la chambre d'imagerie pour réduire le temps d'acquisition de façon significative tout en conservant la haute résolution du système d'imagerie et la structure sous la surface d'imagerie réduisant les déformations appliquées aux tissus. Ainsi, on combine à la fois la méthode de l'histologie sérielle et l'imagerie de face sur bloc (*bloc-face imaging*).

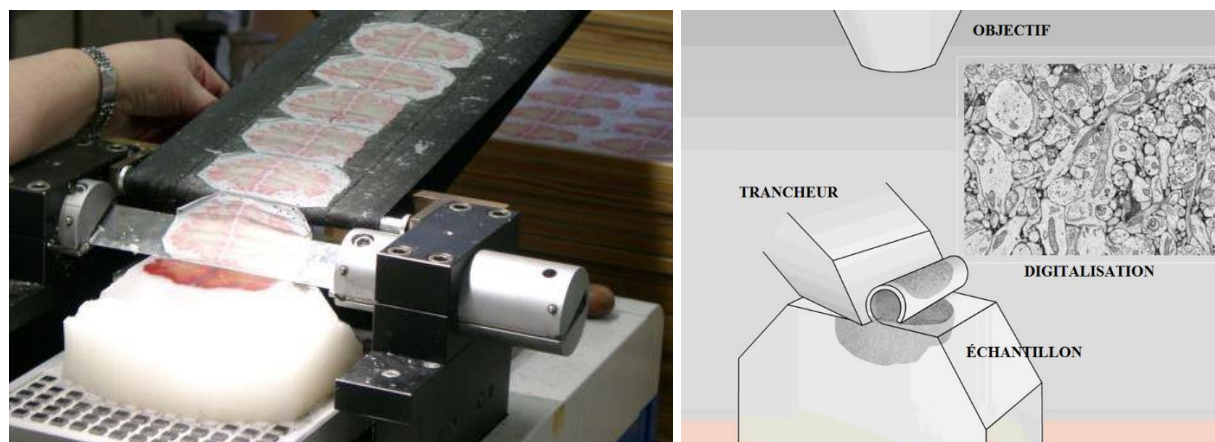


Figure 0.1 : Processus d'imagerie sérielle. Afin d'imager un organe complet, des coupes doivent être effectuées afin de reconstruire l'échantillon dans son ensemble (gauche). Adapté de (Amunts et al., 2013). Combiner la mécanique de tranchage et d'imagerie dans le même système permet une acquisition automatique en limitant les déformations et le déplacement des échantillons (droite). Adapté de (Briggman, Helmstaedter, & Denk, 2011).

L'histologie sérielle est l'imagerie automatisée des cellules d'un échantillon biologique dans le but d'en reconstruire la totalité du volume de façon digitale. En utilisant une puissance de calcul grandissante au fil des ans, il est maintenant possible d'accumuler un grand nombre de données rapidement et de manipuler ces jeux de données afin de pouvoir observer des échantillons biologiques avec le contraste microscopique dans lequel ils ont été imagés. L'imagerie en face sur bloc correspond à l'utilisation d'un milieu de fixation pour maintenir l'échantillon immobile et de couper séquentiellement des tranches à la surface de l'échantillon. Cette combinaison automatisée fut utilisée avec différentes méthodes de fixation afin de sonder les tissus biologiques. Une application connue est la création d'un atlas tridimensionnel cervical de souris réalisé par l'institut du cerveau Allen (Allen's Brain Institute) combinant 1675 spécimens et la microscopie deux-photons (Allen Institute for Brain Science, 2015). De plus, l'utilisation de cette méthode

automatique d'imagerie a permis la construction d'atlas d'expression de ~20 000 gènes dans le cerveau murin mature permettant de placer une pierre fondatrice pour l'observation de changements génomiques dans des études transversales (Lein et al., 2007). Cet effort a permis de corroborer des résultats et d'inspirer des projets de recherche tels que l'observation des fonctions de l'hippocampe chez la souris (Strange, Witter, Lein, & Moser, 2014), la création de souris transgéniques en utilisant de nouvelles stratégies d'identification de gènes pour améliorer la spécificité des marquages génomiques (Madisen et al., 2015) et ce même effort apporta aussi la capacité de reproduire la formation d'un atlas chez l'humain (Hawrylycz et al., 2012).

Dans le cadre de cette recherche, nous désirons utiliser un microscope à fluorescence deux-photons combinant l'imagerie en face sur bloc et l'histologie sérielle afin d'observer le développement de l'AD chez les souris transgéniques APP/PS1. La revue de littérature, au chapitre 2, démontre que ce style de microscopie permet une meilleure profondeur de pénétration dans les tissus biologiques en comparaison avec les systèmes à fluorescence conventionnelle et procure une résolution de l'ordre du micromètre ce qui en fait un système apte à observer les capillaires sanguins au sein de cerveaux murins.

1.2 Objectifs

Plusieurs projets ont déjà été effectués en utilisant des systèmes combinant la microscopie et le tranchage automatique des échantillons. La création d'atlas, facilitée par cette technique d'imagerie, est un outil puissant pour comparer des groupes d'échantillons. Toutefois, au meilleur de nos connaissances, l'application à des maladies spécifiques n'a pas encore été effectuée. Ce projet de maîtrise se divise en deux sections.

Objectif 1

Le premier objectif découlant de ce projet est de reproduire un imageur sériel deux-photons, capable d'imager un échantillon de l'ordre du cm^3 , ayant pour finalité d'imager un grand nombre de cerveaux murins. La conception et la caractérisation de ce système sont décrites au chapitre 3.

Objectif 2

Avec la possibilité d'acquérir des données histologiques de plusieurs échantillons, nous désirons réaliser une étude transversale appliquée au phénomène de la maladie d'Alzheimer en étudiant les vaisseaux sanguins d'un modèle murin transgénique APP/PS1. Afin de porter à terme l'étude suggérée, la mise sur pied d'un pipeline de segmentation et de traitement d'imagerie doit être effectuée. La mise en œuvre de cet objectif a permis l'acquisition des données par imageur sériel deux-photons, leur analyse ainsi qu'à la rédaction de l'article suivant :

Delafontaine-Martel, Patrick, Joël Lefebvre, Phillip Pouliot, Bernard I. Lévy, Pier-Luc Tardif Frédéric Lesage, " Whole brain vascular imaging in a mouse model of Alzheimer disease with two-photon microscopy", Journal of Biomedical Optics, SPIE, 2018

CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 La maladie d'Alzheimer

2.1.1 Mécanismes de la maladie

Différentes hypothèses ont été émises à l'égard des mécanismes de fonctionnement de cette démence. La plus populaire dans ces dernières décennies est l'hypothèse de la cascade d'Amyloïde Beta ($A\beta$) formulée par Hardy J. A. et Higgins G.A. en 1992 (J. A. Hardy & Higgins, 1992) et investiguée plus en détail dans une revue en 2002. L'hypothèse repose sur des gènes mutants codant pour l'APP changeant le caractère biochimique de la protéine et causant une augmentation du ratio de coupures effectuées par les protéases β - et γ -secrétases causant une production accrue d' $A\beta$. Au cours des années, d'autres mutations ont été découvertes (PS1 et PS2) encourageant le métabolisme des protéines APP par le même mécanisme. Par suite, une accumulation trop grande de ces protéines engendre une formation de plaques caractéristiques observées en histologie *post-mortem* chez les patients atteints de l'AD. Ces plaques furent observées pour la première fois en 1907 par Aloïs Alzheimer. Or, la dégénérescence serait causée par une réponse défensive des microglies et des astrocytes face à ces plaques et des effets non connus entre les agglomérations d'APP et les neurones, causant une dégradation progressive et lente des neurones qui amène la neurodégénérescence observée en histologie (J. Hardy, 2002).

Cependant, plusieurs observations ne semblent pas être évidemment explicables par la théorie de la cascade d' $A\beta$. Des observations effectuées par des études transversales montrent que la sévérité de la démence n'est pas linéairement dépendante avec la déposition de plaques d' $A\beta$ et que l'effet cytotoxique des plaques séniles n'a jamais été démontré *in vivo* (De La Torre, 2004) (Schaeffer, Figueiró, Wagner, & Gattaz, 2011). De plus, des expériences tentant de modifier le comportement de la maladie ont échoué à renverser ou, dans certain cas, à ralentir la démence chez des sujets atteints depuis 25 ans et plus, et cela en se basant sur différents mécanismes thérapeutiques tels que réduire la création d' $A\beta$, prévenir l'agrégation des protéines, l'immunothérapie, l'inhibition de la phosphorylation de la protéine tau et encourager la croissance neuronale à l'aide de NGF (*nerve*

growth factor). (Nathan Herrmann Sarah A. Chau Ida Kircanski Krista L. Lanctôt, 2011) (Salomone, Caraci, Leggio, Fedotova, & Drago, 2012).

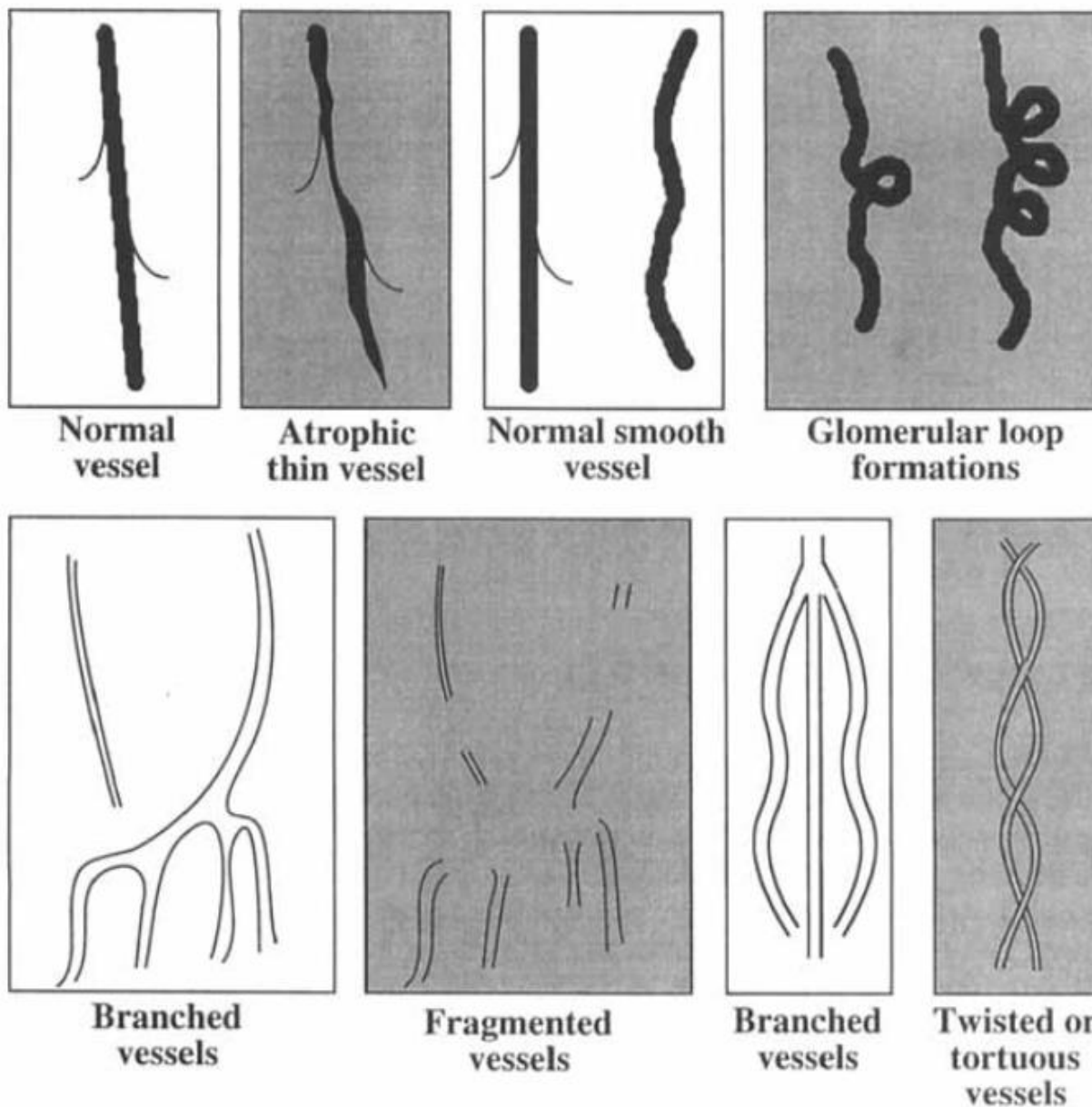


Figure 2.1: Changements morphologiques du système sanguin durant le développement de l'AD. En fond blanc, schématisation de vaisseaux sanguins de patients sains et sur fond gris, schématisation d'observations sur le système sanguin de patients atteints de l'AD. Ces observations démontrent que l'AD semble jouer un rôle sur la viabilité de l'irrigation sanguine au niveau du cerveau. Illustration de Buée et al. 1997.

Dans cette optique, des explications alternatives ont été proposées pour les mécanismes sous-jacents à cette maladie. Une hypothèse proposée en 1993 par J.C. de la Torre suggère le système vasculaire sanguin comme un des premiers acteurs dans l'AD. Par exemple, certains facteurs de risque de la maladie comme l'athérosclérose, l'hypertension, l'hypotension, l'arythmie cardiaque, des épisodes de thrombose ou de la fibrillation atriale sont tous reliés par leur influence sur le système cardio-vasculaire (De La Torre, 2004) (Cifuentes et al., 2015). De plus, différents changements morphologiques au niveau des vaisseaux sanguins sont perceptibles lors du développement de la maladie (Buee, Hof, & Delacourte, 1997). Des observations comme l'atrophie, la formation de boucles glomérulaires, la fragmentation et l'entortillement des vaisseaux démontrent que l'AD semble jouer un rôle important dans la viabilité de l'irrigation sanguine des vaisseaux sanguins (voir Figure 2.1).

Des observations additionnelles semblent démontrer un changement aussi au niveau de la population des vaisseaux sanguins. En effet, une néovascularisation pouvant être expliquée par une perfusion réduite et de l'inflammation serait une hypothèse envisagée. La détection de facteurs de croissance endothéliale (VEGF), de facteurs de croissance en transformation β (TGF β) et de facteurs nécrosants de tumeur α (TNF α) semble suggérer que l'angiogenèse est un acteur causant la déposition de plaques A β (Vagnucci & Li, 2003). Pour ajouter aux observations, des VEGF et une perte plus grande de densité de vaisseaux sanguins ont été notés dans des modèles murins combinant l'hypertension et l'Alzheimer comparativement à des modèles d'hypertension uniquement contribuant à l'idée que des mécanismes au niveau de l'AD causent tort à l'irrigation de l'organe (Cifuentes et al., 2015).

Dans le cadre de ce projet, nous désirons observer les changements au niveau de la densité du système vasculaire sanguin dans différentes régions du cerveau. Les régions d'intérêt (ROI) sélectionnées dans l'étude sont les hippocampes et le cortex médial préfrontal associés à différentes fonctions au niveau de la mémorisation ou la consolidation (Cohen et al., 1997; Ryan et al., 2001). De plus, ces ROI ont été présélectionnées, car ces zones présentent plusieurs changements lors du développement de l'AD telles que de l'atrophie (Callen, Black, Gao, Caldwell, & Szalai, 2001) et des lésions au niveau de la matière blanche (de Leeuw, Barkhof, & Scheltens, 2004).

2.1.2 Modèle transgénique murin

La découverte des gènes causant l'AD familiale a ouvert la capacité de simuler le développement de l'AD. Par la surexpression du gène APP, il est possible de reproduire les observations histologiques et ceci est la stratégie la plus commune pour causer une production de plaques séniles. Cependant, l'utilisation de ces modèles transgéniques est débattue. Cette surexpression est nécessaire, car les souris non transgéniques ne développent pas de façon naturelle des plaques d'A β contrairement aux humains. De plus, les souris exprimant les gènes APP et créant des agglomérats A β ne semblent pas démontrer de signes importants de détérioration neurologique. Considérant ces observations, des mutants génétiques déviant du gène APP sont plus utilisés afin de mieux reproduire la neuropathologie observée chez l'humain (Kitazawa, Medeiros, & M. LaFerla, 2012).

Le modèle transgénique utilisée dans ce projet est la branche génétique APP/PS1 développée par Rebecca Radde (Radde et al., 2006) qui est une combinaison d'une souris exprimant à la fois le gène APP muté KM670/671NL et le gène PS1 (L166P). Les particularités de ce modèle comportent : une expression accrue des gènes insérés, une formation accrue de plaques séniles tôt dans le développement de la souris et une capacité d'apprendre affaiblie comparée aux souris contrôles. L'utilisation de ce modèle murin a été préconisée, car la disponibilité de ces échantillons a été facilitée par une collaboration avec Dr Bernard Lévy de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm).

2.2 Microscopie tomographique sérielle

La microscopie tomographique sérielle combine deux techniques : le sectionnement des tissus sur place et l'imagerie en face sur bloc (*bloc-face imaging*) (Odgaard, A., K. Andersen, F. Melsen, 1990; Ragan et al., 2012). La méthode conventionnelle d'imager des tissus biologiques est de déposer et fixer l'échantillon sur une lamelle de verre et de le déplacer sous l'objectif du microscope. Cependant, cette méthode est très coûteuse en temps et peut engendrer des déformations de l'échantillon.

Une technique maintenant utilisée est l'imagerie en face sur bloc consistant à imager la surface de l'échantillon fixée dans une matrice de soutien pour prévenir les déformations liées à la fixation et

à la manipulation. La combinaison de cette technique avec le tranchage automatique des tissus permet des acquisitions d'échantillons complets sans interaction humaine.

Celle-ci est utilisable avec plusieurs méthodes d'ancrage des tissus telles que la cryo congélation (Richter, Sattler, Wiesendanger, Wittern, & Wepf, 2003), l'utilisation de la paraffine (Briggman et al., 2011) ou de l'agarose (Ragan et al., 2012). Chacune combinée avec un microtome permet des coupes minces de l'ordre de 5 à 10 μm d'épaisseur. Cependant, avec des systèmes d'imagerie permettant d'imager sur plusieurs centaines de micromètres d'épaisseur comme la microscopie par tomographie à cohérence optique (OCT), cette résolution de coupe devient désuète puisqu'il n'est plus nécessaire d'échantillonner autant de coupes.

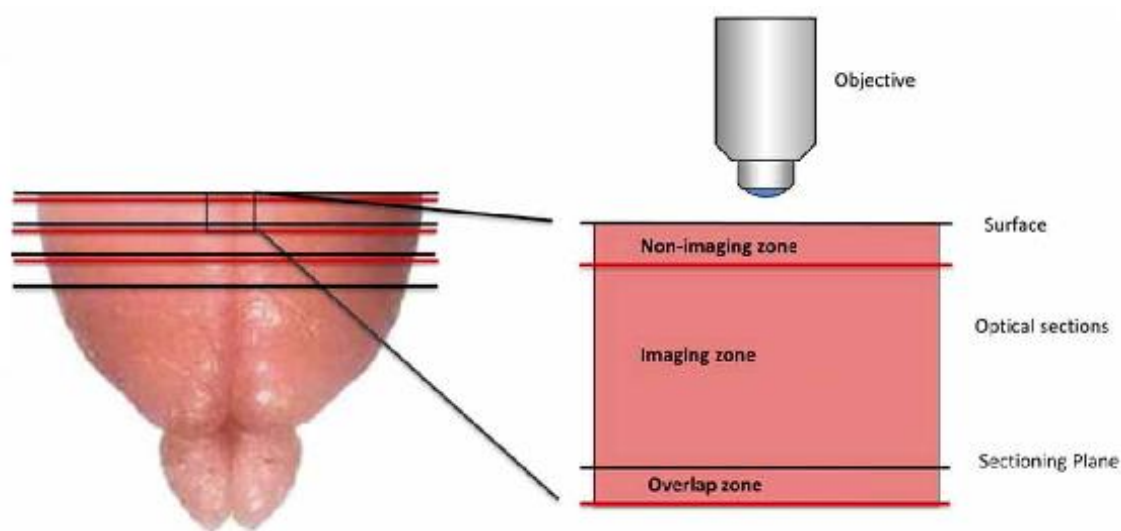


Figure 2.2 : Schématisation de la microscopie tomographique sérielle. Suite à l'acquisition au niveau de la section optique (*imaging zone*) et de la zone de superposition (*overlap*), le retrait de la zone d'imagerie est effectué avec un microtome pour exposer une nouvelle surface sans perte de données. Adapté de (Amato, Pan, Schwartz, & Ragan, 2016).

2.3 Microscopie deux-photons

2.3.1 Théorie

Prédit en 1931 avant l'avènement des lasers, Maria Göppert-Mayer élaborait le concept que certains modèles atomiques pourraient interagir avec deux particules de lumière en même temps permettant la combinaison de l'énergie de ces deux particules de lumière (Göppert-Mayer, 1931). Dans cet effet non linéaire d'absorption, l'énergie nécessaire pour qu'un électron atteigne le niveau d'excitation est le double de la lumière utilisée ($\Delta E = 2h\omega$). Suite à l'excitation, l'électron se relaxe par des processus non électromagnétiques (excitation vibrationnelle moléculaire ou rotationnelle), jusqu'à ce qu'il tombe dans un niveau énergétique lui permettant d'effectuer une transition électromagnétique permise par les lois de sélection. Cette dernière transition entraîne l'émission d'un photon d'une énergie moindre correspondant à un signal de fluorescence (Gilbert Grynberg, 2010)(Wang, L. V., Wu, 2007). Cette technique utilise parmi d'autres une longueur d'onde d'excitation de 800 nm causant un signal en fluorescence pour une excitation d'environ 400 nm. Afin de détecter ce contraste, on ajoute un filtre diélectrique pour bloquer les rayonnements d'excitation et pour conserver que la désexcitation des molécules fluorescentes.

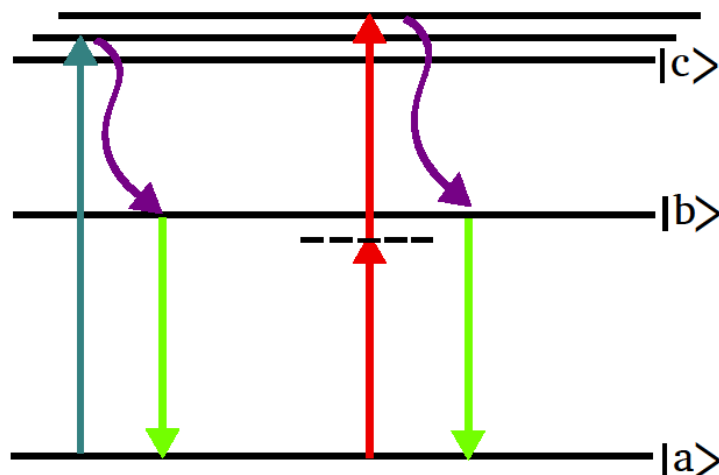


Figure 2.3 : Modèle atomique pour l'absorption deux-photons. À gauche, excitation électronique effectuée par une lumière à haute énergie (bleu) pour effectuer la fluorescence. Des processus internes (mauve) réduisent l'énergie de l'électron et l'amènent à l'état b de plus faible énergie.

L'émission de la fluorescence est représentée en vert. Contrairement à la fluorescence conventionnelle, l'absorption deux-photons (à droite) utilise deux particules de lumière de basse énergie (rouge). Cependant, ce processus nécessite un état virtuel d'excitation représenté par la ligne pointillée.

C'est en 1990 que le premier brevet de microscopie deux-photons a été déposé par Winfried Denk et James Strickler. Ce principe de microscopie combine les récentes avancées en laser haute puissance et des systèmes de balayage par miroirs (Denk, Strickler, & Webb, 1990). Un laser titane-saphire est une technologie permettant des pulses laser de l'ordre du 100 femtosecondes avec une énergie maximale dans l'impulsion avoisinant les 125mJ. Cette énergie est nécessaire pour créer l'effet deux-photons, car la probabilité qu'un tel événement se produise est régie par la section efficace qu'une molécule effectue le phénomène multiplié par l'intensité de la source lumineuse au carré. L'ordre de grandeur attendu pour la section efficace est $\sim 1 \cdot 10^{-50} \text{ cm}^4\text{s/photon}$ (Xu & Webb, 1996), expliquant pourquoi l'effet d'absorption deux-photons n'est pas un événement naturel de la vie de tous les jours.

Une caractéristique de ces systèmes d'imagerie est la longueur d'onde utilisée constituée principalement en des longueurs d'onde d'excitation dans le proche infrarouge (NIR). Certains avantages peuvent être retirés de l'utilisation d'une telle source. Par exemple, les interactions telles que l'anisotropie de la diffusion et l'absorption sont amoindries à l'intérieur des tissus biologiques (Cheong, Prahl, & Welch, 1990; Jacques, 2013; Simpson, Kohl, & Essenpreis, 1998) ce qui a pour effet d'augmenter la profondeur de pénétration de la lumière et de permettre une imagerie sous la surface des tissus biologiques de plusieurs dizaines de micromètres (Helmchen & Denk, 2005).

Afin de caractériser un microscope, un facteur important à tenir en compte est la fonction de réponse impulsionnelle (PSF). En théorie, la PSF intervient lorsque l'image observée par le microscope est une fonction ponctuelle telle une distribution de Dirac. Un étalement gaussien de la distribution sera alors causé par l'optique du microscope et perçu par l'observateur. Cet étalement est une représentation de la PSF qui dégrade la résolution par l'application d'une convolution de toutes les images perçues par le microscope. Cet outil contient plusieurs applications en traitement d'image où il est possible de déconvoluer l'image acquise avec la PSF (Scalettar, Swedlow, Sedat, & Agard, 1996). Cette fonction de réponse peut être très différente

d'un système d'imagerie à un autre. Dans le cas de la microscopie deux-photons, comparativement à la microscopie en fluorescence, la PSF est réduite par la nécessité d'une interaction de deux particules de lumière menant à une PSF proportionnelle à l'intensité au carré. En pratique, la zone d'excitation ne comprend que le plan focal du système d'imagerie contrairement à la fluorescence qui reçoit du signal de plusieurs profondeurs différentes (voir Figure 2.4).

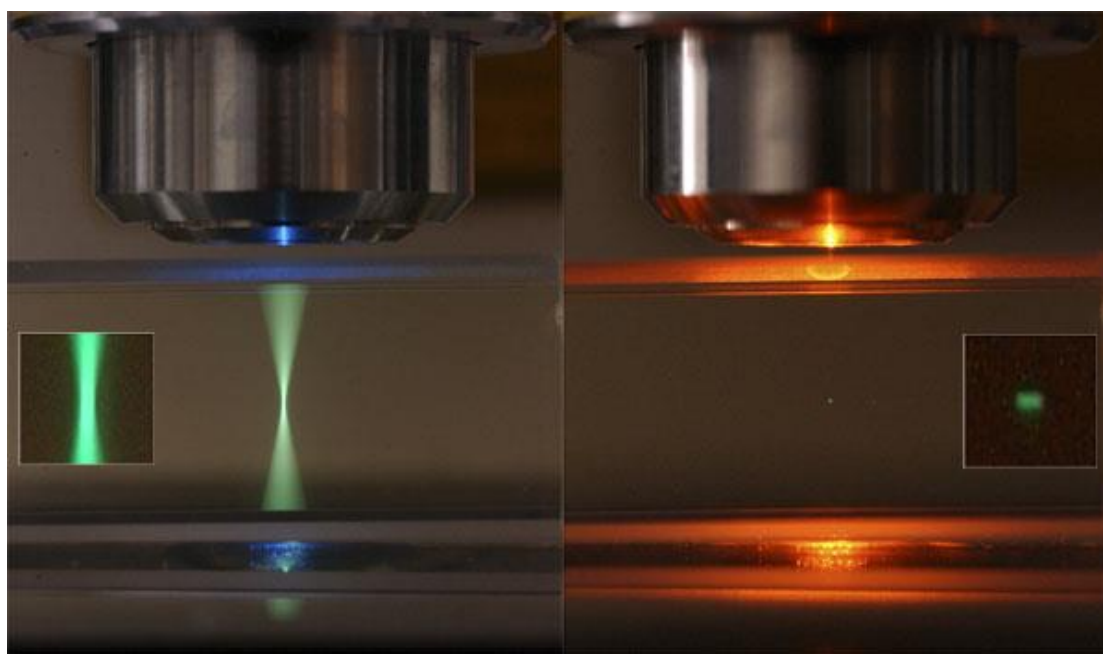


Figure 2.4 : Différence entre la PSF en fluorescence et en microscopie deux-photons. À gauche, la microscopie en fluorescence offre une illumination sur une grande longueur causant une détection de la fluorescence sur plusieurs profondeurs. À droite, la microscopie deux-photons effectue une excitation seulement au plan focal de l'objectif. Ainsi, la détection de fluorescence deux-photons est très sélective et peu bruitée par du signal hors plan. Image de (Aaron, n.d.)

Afin de détecter que le plan d'imagerie du microscope, différentes techniques sont utilisées. En microscopie en transmission comme certains systèmes CARS ou SRS, l'utilisation d'un objectif de collection est utilisée à l'opposé du système d'excitation (Lipinski & Hopkins, 2004). En Epifluorescence, l'utilisation d'un sténopé (*pinhole*) au niveau du système d'agrandissement du microscope (R.H., 1996) permet de sélectionner un plan de détection. Contrairement à ces approches, la microscopie deux-photons génère en elle-même une sélectivité du plan d'imagerie.

La détection est ensuite faite par l'utilisation d'un tube photomultiplicateur (PMT) suivant un filtre diélectrique afin de sélectionner la lumière d'excitation désirée. Puisque la zone de fluorescence deux-photons est restreinte dans l'espace, on suppose que tout le signal envoyé vers la PMT vient seulement de ce point de fluorescence. Ainsi, aucune technique spécifique n'est nécessaire pour filtrer le plan d'imagerie autre que l'isolation avec une chambre noire afin éviter que de la lumière externe au système cause du bruit.

En théorie de diffraction, il est possible de comprendre la PSF comme un phénomène se produisant lorsque les ondes électromagnétiques se propagent au travers d'une ouverture. En microscopie conventionnelle, on peut considérer des lentilles optiques comme un générateur de lumière avec une ouverture circulaire représentée par la ceinture du profil gaussien entre les deux lentilles (voir Figure 2.5).

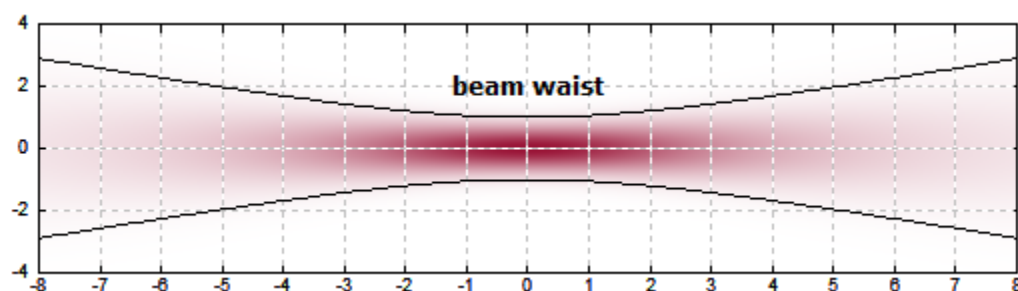


Figure 2.5 : Ceinture du faisceau lumineux. Un faisceau gaussien contient plusieurs caractéristiques dont une des plus connues est le concept de la ceinture qui représente l'endroit où le faisceau détient le plus petit rayon. Pour la théorie de diffraction, on peut conceptualiser cette caractéristique comme un sténopé pour un faisceau parfait.

En modélisant une onde comme un objet oscillant et en prenant compte la condition de Fraunhofer ou l'approximation de champs éloignés qui consiste à interpréter les fronts d'onde comme étant parallèles, il est possible d'évaluer théoriquement la grandeur de la PSF. Afin d'y parvenir, on utilise l'intégrale de Kirchhoff permettant de connaître le profil d'une onde ϕ , peu importe le parcours effectué en calculant les contributions de l'entourage (Leonelli, 2014) :

$$\phi(P_o) = \frac{1}{4\pi} \oint_S \left[\frac{e^{ikR}}{R} \nabla \phi - \phi \nabla \left(\frac{e^{ikR}}{R} \right) \right] \cdot \hat{n} da \quad (2.1)$$

où R est la distance vectorielle séparant deux points dans l'espace P_o et P_1 , ϕ est la fonction d'onde et S est la surface du volume étudié. On utilise une configuration dans laquelle une surface avec un trou bloque la lumière incidente.

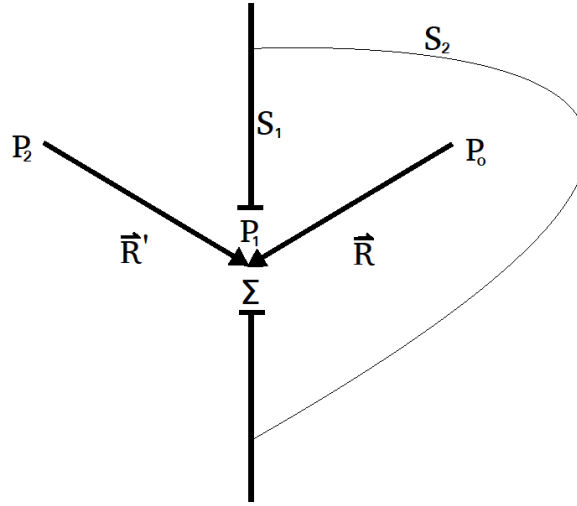


Figure 2.6 : Configuration pour l'intégrale de Kirchhoff. Un faisceau incident prenant le chemin R' traverse la fente de forme Σ . Afin de calculer le profil de diffraction au point P_o , l'intégrale sur les trois surfaces S_1 , S_2 et Σ permet de sommer les contributions au profil d'onde.

L'amplitude de l'onde utilisée est :

$$\phi(P_1) = A \frac{e^{ikR}}{R} \quad (2.2)$$

En séparant la surface d'intégrale en trois parties, on peut raisonner que l'amplitude de l'onde sur la surface S_2 , si celle-ci tend vers l'infini, sera de zéro et que sur la surface S_1 l'onde est absorbée et ne contribuera pas au phénomène de diffraction au point P_o . Alors, en calculant les gradients appropriés sur la surface restante Σ , on retrouve la forme de diffraction Fresnel-Kirchhoff :

$$\phi_{diff}(P_o) = \frac{ikA}{4\pi} \oint_{\Sigma} \left[\frac{e^{ik(R+R')}}{RR'} \right] \hat{n} (\hat{R}' - \hat{R}) \cdot da \quad (2.3)$$

Cependant, cette forme d'intégrale est difficilement analytiquement solvable. Pour faciliter les processus, on peut considérer la fente Σ comme étant bien plus petite que les distances R et R' . Ainsi, d'un point de vue du point P_o , ces deux distances peuvent être prises comme constantes dans l'équation et retirées de l'intégrale, en assurant les conditions de Fraunhofer et en transformant les longueurs en fréquence spatiale on obtient :

$$\phi_{diff}(P_o) = C \iint_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-i(\omega_x x + \omega_y y)} dx dy \quad (2.4)$$

où C représente les termes constants de transformation et que la fonction $f(x, y)$ représente l'ouverture en deux dimensions par laquelle la lumière passe. Cette forme connue nous permet de remarquer que le patron de diffraction est proportionnel à la transformée de Fourier. La transformation de cette fonction en coordonnée cylindrique permet la modélisation d'un trou cylindrique afin de simuler la forme d'un sténopé. Le résultat de cette transformation de coordonnées permet de percevoir la forme de réponse d'un microscope parfait et la réponse peut s'exprimer par des fonctions de Bessel de premier ordre :

$$\frac{I_{diff}(\rho)}{I_o} = \left[\frac{2J_1(x)}{x} \right]^2 \quad x = \frac{2\pi\rho a}{\lambda R_o} \quad (2.5)$$

où ρ est la coordonnée radiale cylindrique, a est le rayon de l'ouverture circulaire, λ est la longueur d'onde et I_o représente l'intensité initiale de l'onde incidente. Ce patron de diffraction est la représentation d'une PSF d'un microscope parfait.

Pour la microscopie confocale utilisant deux sténopés, dont un pour la détection et un pour l'excitation, impose que la PSF soit multipliée par elle-même permettant une augmentation de résolution remarquable.

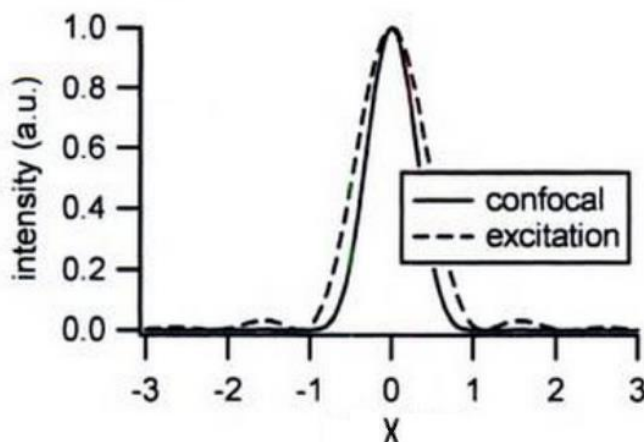


Figure 2.7 : Différence de PSF entre confocal et un microscope conventionnel. Puisque le microscope confocal contient deux sténopés dans le parcours optique, la fonction de réponse s'en voit améliorer et devient la PSF^2 . Cependant, cette technique vient au prix de sacrifier de l'intensité du signal. Adapté de (Muller, n.d.)

On se doit de mentionner aussi que l'on peut considérer un microscope deux-photons comme étant la fonction de réponse de deux excitations. Ainsi, la PSF se retrouve aussi à être multipliée par elle-même comme la microscopie confocale. Cependant, puisque la longueur d'onde fait partie de l'équation, on remarque qu'une longueur d'onde plus grande causera au profil de diffraction un élargissement. De ce point de vue, la microscopie confocale permet une PSF plus petite que la microscopie deux-photons, mais la profondeur de pénétration des ondes NIR dans les tissus biologiques est plus grande et l'intensité d'excitation et celle d'émission sont conservées.

Un avantage supplémentaire vient de la différence spectrale entre la lumière d'excitation et celle d'émission. En effet, la fluorescence conventionnelle vient avec une difficulté de séparation de spectres. Puisque la différence spectrale entre l'absorption de lumière et l'excitation n'est due que par des processus internes aux molécules, ces deux spectres ont tendance à se superposer dans un phénomène appelé le chevauchement spectral. Cet effet implique qu'il n'est pas toujours possible de bien séparer la lumière d'excitation et celle d'émission. Cependant, la microscopie deux-photons possède une large différence entre le spectre d'excitation et celui d'émission ce qui permet une

sélection facile d'un filtre diélectrique sans perte de signal important (Alexandros A. Lavda, n.d.), réduisant le bruit dans l'image et augmentant le signal d'acquisition possible.

Ces techniques d'imagerie par fluorescence peuvent acquérir des images histologiques à haute résolution et distinguer des structures morphologiques étiquetées à l'aide de sondes fluorescentes. Cependant, lors d'études utilisant le traitement d'image, il est important de bien identifier les structures étudiées. En effet, la microscopie en fluorescence peut parfois être bruitée et nécessite des protocoles d'analyse afin de segmenter ce qui est pertinent dans l'acquisition.

2.4 Méthodes de segmentation

Pour l'étude des vaisseaux sanguins, il est important d'appliquer un processus permettant de mettre en valeur leur morphologie et de rehausser leur contraste. En numérisant les résultats histologiques, il est possible d'interpréter l'image comme un objet mathématique sur lequel des transformations sont possibles afin de retirer l'information souhaitée de celle-ci.

Comme expliqué dans (Lesage, Angelini, Bloch, & Funka-Lea, 2009), il existe trois axes à un processus de segmentation : le modèle considéré, les caractéristiques de l'image et les méthodes d'extraction. Le modèle comprend toutes les assumptions faites sur les vaisseaux étudiés telles que leur longueur, leur grosseur, leur complexité de réseau et leur intensité dans l'image. Dans notre cas, nous désirons segmenter des vaisseaux sanguins. Alors, on suppose que les structures observées seront de formes tubulaires et organisées sous la forme d'un réseau. Les caractéristiques regroupent toutes les métriques mesurables dans l'observation des vaisseaux telles que leurs courbures ou leurs points d'attache. Les méthodes d'extraction sont les outils algorithmiques utilisés pour effectuer l'extraction sur la base du modèle proposé et les caractéristiques d'une image. Chaque méthode d'extraction comprend un mélange de ces trois facettes.

Une méthode de rehaussement de vaisseaux est présentée dans (Martinez-Perez, Hughes, Thom, Bharath, & Parker, 2007). Se concentrant sur la segmentation du système sanguin dans l'œil, une segmentation à différents ordres de grandeur est utilisée puisque la population des vaisseaux est très hétérogène. Ainsi, l'utilisation de convolutions gaussiennes ayant des noyaux de tailles différentes permettent de filtrer les structures de hautes fréquences spatiales. Lorsque les formes dans l'image sont plus petites que la gaussienne utilisée, il en résultera une suppression de ces

structures permettant un meilleur accent aux structures plus imposantes. En changeant l'analyse des structures selon leurs grosseurs, il est possible de mettre en relation les différentes analyses et de former une méthode d'extraction à plusieurs échelles de grandeur.

Un outil existant pour la segmentation de forme tubulaire, que ce soit des vaisseaux sanguins ou des neurones, est l'utilisation des vecteurs propres de courbures dans l'image. En effet, en considérant une image comme un outil mathématique, il est possible d'appliquer les mêmes dérivations qu'une surface dont les pixels représentent la hauteur. Alors, on définit un espace local d'une image comme sa dérivation en série de Taylor autour d'un point x_o à une échelle de grandeur s :

$$L(x_o + \delta x_o, s) = L(x_o, s) + \delta x_o^T \nabla_{o,s} + \delta x_o^T H_{o,s} \delta x_o \quad (2.6)$$

où $\nabla_{o,s}$ est le vecteur gradient de L et H est la matrice Hessienne pour une image en deux dimensions dans le voisinage de x_o . Le vecteur gradient nous informe sur l'inclinaison du signal dans la direction choisie.

$$H = \begin{bmatrix} \delta_{xx} & \delta_{xy} \\ \delta_{yx} & \delta_{yy} \end{bmatrix} \quad (2.7)$$

L'opérateur Hessien correspond aux dérivées secondes et nous renseigne sur la courbure du signal. Le résultat de cette transformation sur l'image est une matrice contenant comme vecteur propre \bar{u}_1 et \bar{u}_2 et comme valeurs propres λ_1 et λ_2 . D'un point de vue géométrique, ces vecteurs représentent la courbure du voisinage étudié. Ainsi, en formant une métrique basée sur la grandeur de ces vecteurs, il est possible de former une carte de probabilité en deux dimensions de la présence d'une structure tubulaire avec l'échelle de grandeur choisie. Cette métrique est présentée par (Frangi, Niessen, Vincken, & Viergever, 1998) et (Yoshinobu Sato, 1998) et est surnommée le *vesselness* d'une image. Ainsi, une surface tubulaire sera rehaussée en prenant compte que les valeurs propres de la matrice Hessienne.

2.4.1 Méthode d'extraction des vaisseaux sanguins

Suite au rehaussement, il faut une méthode d'extraction de vaisseaux sanguins. Pour ce faire, la revue de littérature présentée par (Kirbas, C. Quek, 2004) effectue une liste des techniques contemporaines de segmentations. De nos jours, l'augmentation de la puissance de calcul des ordinateurs permet d'utiliser des outils avec une plus grande complexité. Ainsi, il est possible d'utiliser des outils tels que : (1) des approches basées sur la reconnaissance de formes; (2) des techniques par modèles; (3) des approches basées sur l'intelligence artificielle; (4) des approches reposant sur les réseaux neuronaux; (5) des méthodes par contour actif. Malgré que ces techniques de segmentation ne soient pas exclusive, dans le cadre de ce mémoire, on a utilisé la reconnaissance de formes comme méthode de segmentation, car les processus de calculs sont rapides et une préparation méthodique n'est pas requise comme dans le cas de l'entraînement de réseaux neuronaux nécessitant un grand nombre d'échantillons étiquetés.

Alors, une technique de rehaussement déjà démontrée par matrice Hessienne combinant la convolution d'une gaussienne et le calcul différentiel de l'image a été utilisée. Suite à ce processus, une technique de discrimination au niveau de l'histogramme permettra de sélectionner les vaisseaux sanguins ainsi rehaussés. La méthode d'Otsu (Smith et al., 1979) correspond à l'optimisation d'une somme pondérée qui veut minimiser la variance entre les classes :

$$\sigma^2 = \omega_1(t)\sigma_1^2(t) + \omega_2(t)\sigma_2^2(t) \quad (2.8)$$

où ω_i et σ_i représentent respectivement la probabilité de classe et la variance avant (1) ou après (2) le seuil imposé t . Cette méthode requiert alors le calcul de cette somme considérant tous les seuils t possibles dans l'histogramme fourni et génère un masque comprenant la ségrégation optimale des deux groupes. L'avantage de cette technique est l'automatisation facilitée de celle-ci et la présomption que deux classes soient présentes dans l'image. Dans notre cas, les deux classes sont : le bruit de l'image que nous voulons ignorer et les vaisseaux sanguins rehaussés. De plus, cette technique d'optimisation ne nécessite pas de seuil fixe qui permet de s'adapter selon le contenu de la surface observée.

D'autre part, il est important de mentionner l'ascendance d'une technologie : les réseaux neuronaux. Ces systèmes performants sont programmés comme étant des systèmes statistiques

pouvant contenir plusieurs étapes de convolutions. L'utilisation de ces systèmes peut s'expliquer comme une fonction que l'on applique sur une image et dont la réponse est ce pour quoi le système a été entraîné. De nos jours, ces systèmes se voient attribuer plusieurs tâches diverses telles que la reconnaissance vocale ou d'image (Nasr-Esfahani et al., 2018), la potency de médicaments et même la prédiction de séquençage d'ADN sur l'expression des gènes et de maladies (Lecun, Bengio, & Hinton, 2015). Cependant, l'entraînement est la partie la plus laborieuse de cette technique. Pour y parvenir, des échantillons de référence doivent être étiquetés pour représenter la réponse que l'on attend du système. Par optimisation, telle que la descente de gradient, il est possible de changer les poids statistiques des différents niveaux de traitement. Ce processus nécessite plusieurs images étiquetées afin que le système converge et devienne robuste. Par exemple, la banque de données MNIST (Lecun, 1998), consistant à un ensemble de données de 60 000 chiffres écrits à la main est disponible afin d'entraîner ce style de réseau neuronal à la reconnaissance d'écriture. Cette embûche est considérable dans le domaine scientifique où le nombre d'échantillons disponibles pour l'optimisation est souvent faible. Pourtant, différentes techniques permettent de pallier ce problème. Par exemple, les réseaux neuronaux de diffusion (DNN) tentent d'appliquer des théories afin de relier les différentes images entre elles et d'ajouter des échantillons à l'ensemble des images d'entraînement. Ce style d'ajout peut compromettre toutefois la validité du système et affecter sa précision (Ruparel, Shahane, & Bhamare, 2013).

2.5 Atlas de cerveau murin

La neuroscience moderne utilise de plus en plus des atlas digitaux de cerveaux afin de localiser et de comprendre des structures anatomiques complexes. Cette méthode utilisée en tractographie (Hagler et al., 2009) et en expression de gènes (Gong S. Zheng C., 2003) est particulièrement efficace afin de comprendre et répertorier les régions cervicales des animaux. Un outil disponible à la communauté de neuroscience est l'atlas de cerveau provenant de l'institut Allen. Comme mentionné plus tôt, cet atlas combinant 1675 cerveaux par histologie tomographique sérielle est indexé afin de sélectionner différentes parties désirées dans l'organe (Anderson, n.d.). La création de tels atlas a permis la réalisation de plusieurs avancées technologiques en traitement d'image. Cette section se concentrera sur les outils développés afin de construire des atlas histologiques.

2.5.1 Outil de normalisation avancé

Communément appelé ANTS de son acronyme venant de *advanced normalization tools* (Avants, Tustison, & Song, 2009), cet outil est une plateforme détenant une librairie de multiples transformations. Utile pour le recalage et la normalisation comme son nom l'indique, il est utilisé comme moyen de transformation pour cartographier un espace d'images à un autre. Pour y parvenir, le programme fait appel à des métriques et des transformations affines, élastiques et diffeomorphiques. Les transformations affines comprennent le cisaillement, l'agrandissement, la rotation et la translation.

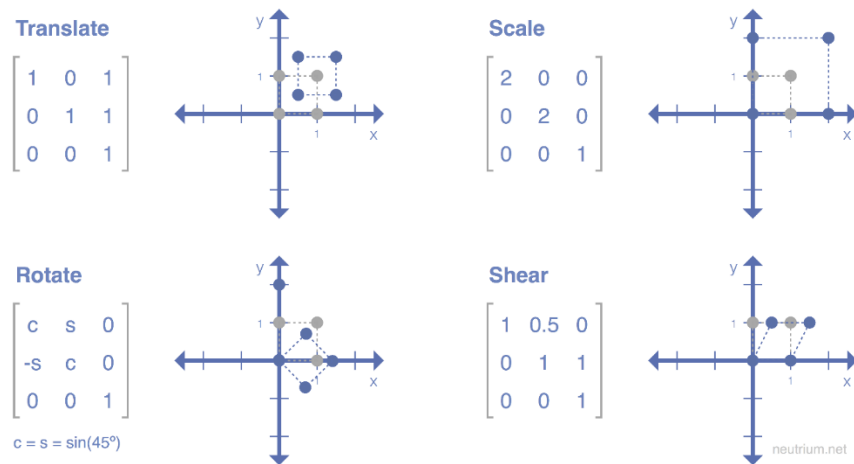


Figure 2.8 : Transformations affines. La structure matricielle des transformations possible par l'outil ANTS. Dans la structure du programme cependant, une colonne supplémentaire est ajoutée afin de comprendre la translation. Donc, la forme des matrices utilisées est de 4x4. Image provenant de (Neutrom, n.d.).

Si les transformations précédentes ne suffisent pas, le module contient aussi une librairie de transformations élastiques. Afin d'expliquer la méthode, considérons une image I que l'on veut superposer sur une image J. Pour accumuler les transformations pour passer d'un espace à un autre,

un champ de transformation $u(x)$ est utilisé sur l'image I . Dans un monde parfait, ce champ de transformation serait en lui seul efficace pour passer d'une image à une autre. Ce processus consiste en un calcul de gradient de la similarité pouvant être exécuté par différents programmes, par exemple Matlab :

$$\nabla E = \partial_u \Pi(I(x), J(x + u(x))) \quad (2.9)$$

suivi par une mise à jour du champ de transformation qui correspond à l'ajout d'un élément suivant le gradient :

$$u(x) \leftarrow u(x) + \delta \nabla E \quad (2.10)$$

et un adoucissement du champ avec une convolution gaussienne afin d'alléger les irrégularités du gradient.

$$u(x) \leftarrow G_\sigma * u(x) \quad (2.11)$$

Cependant, ce style de transformation peut être inadéquat pour des transformations nécessitant de grands volumes à déplacer. Un problème récurrent qui peut survenir avec ce style de transformation est une non-conservation de l'isomorphisme de l'image. En effet, les transformations élastiques ne conservent pas nécessairement la topologie de l'image. Alors, des classes de fonctions appelées difféomorphiques sont utilisables par le programme. Ces transformations contiennent plusieurs propriétés telles que : (1) ayant une dérivée, donc elles sont réversibles et elles ne perdent pas d'information dans l'image; (2) étant lisses qui ne nécessitent pas d'opérations afin d'aplanir le champ de transformation suite à un processus d'optimisation permettant ainsi de traiter de grands volumes avec une fidélité morphologique accrue.

2.5.2 Étude statistique

Lors d'études utilisant plusieurs échantillons, il est important de baser les observations sur des fondements des mathématiques statistiques afin de comparer les différents groupes et d'en ressortir une conclusion. En recherche, l'utilisation de l'hypothèse nulle, c.-à-d. qu'aucune différence

n'existe entre deux groupes d'échantillons, est préconisée. Cette supposition peut être testée par le biais de différents tests statistiques tels que la corrélation entre-deux ou multiples variables, le test T de Student ou le test du Chi carré (Harms, 2010). Dans le cas nous intéressant, le test T de Student est un bon discriminant afin de comparer deux groupes d'échantillons. Cependant, dans des cas nécessitant plusieurs comparaisons au sein d'un même échantillon, ce test peut s'avérer inefficace. Un cas bien connu est l'utilisation de tels algorithmes appliqués sur image provenant de l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (fMRI). Cette technologie permet d'observer différentes régions du cerveau et de les combiner avec une tâche effectuée par la personne étudiée. Les résultats de tels tests sont observés sous forme d'image quadridimensionnelle avec une résolution typique de $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$ (Goense, Bohraus, & Logothetis, 2016) impliquant des images contenant près de 80 000 pixels pour chaque échantillon. Chacun de ces pixels doit être comparé spatialement par leurs homologues dans les différents échantillons. Or, la probabilité de trouver des points statistiquement significatifs de ce style d'imagerie est très élevée.

Une méthode existante pour réduire les faux positifs est l'application d'un facteur divisant le seuil de discrimination des deux groupes. Ce seuil est communément appelé la correction de Bonferroni. La valeur du coefficient divisant le seuil sera liée au nombre de tests T de Student appliqué sur l'échantillon. Par exemple, si nous désirons effectuer la comparaison de deux groupes d'échantillons contenant chacune 4 valeurs et nous voulons connaître localement l'importance statistique pour chaque valeur, le coefficient de 4 divisera le seuil de 0.05. Or, l'augmentation du nombre de tests avec la correction de Bonferroni réduit les chances que de faux positifs surviennent dans l'analyse. Cette technique comporte toutefois des problèmes majeurs dans le cas d'échantillons larges. Comme mentionné plus tôt, le nombre de pixels étudié dans le cas du fMRI est d'environ 80 000. Ce qui impliquerait une correction de Bonferroni de cet ordre de grandeur rendant impossible toute capacité à distinguer ce qui est statistiquement significatif.

Pour répondre à cette problématique, le programme *Statistical Parametric Mapping* (SPM) mis en place sur la plateforme de programmation Matlab implémente la théorie de champs gaussiens (GRF) qui est une correction moins sévère que la correction de Bonferroni exploitant les corrélations locales entre points. Cette méthode détient comme avantage une estimation de la variance de l'erreur dans l'échantillon et de la souplesse de l'image. Cette minimisation de paramètres amène la méthode SPM à une bien meilleure sensibilité que d'autres approches

paramétriques (Friston, 2003) et est grandement utilisée afin de discerner des différences statistiques dans différentes modalités d'imagerie telles que la tomographie par émission de proton, le fMRI et l'électroencéphalographie (Dale et al., 2000).

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

La réalisation de ce projet se divise en 4 parties. La première comprenant le fonctionnement du système d'imagerie et sa caractérisation afin de connaître les paramètres d'imagerie. La seconde étant la préparation des échantillons, une technique générale afin de perfuser les vaisseaux sanguins avec un mélange de gélatine et de fluorophore jusqu'à la fixation de celui-ci dans une matrice d'agarose. La partie suivante se concentrera sur le vibratome et son utilisation. La dernière partie visera à démontrer la reconstruction des échantillons, leur traitement afin de segmenter les vaisseaux sanguins et l'analyse effectuée sur les échantillons.

3.1 Microscope à fluorescence deux-photons

Dans cette section, la microscopie deux-photons a été choisie comme modalité d'imagerie pour sa capacité d'imager en profondeur dans les tissus biologiques, sa résolution améliorée par rapport à la microscopie par fluorescence et le SNR accru. Cette technique nécessite cependant une source laser puissante afin d'assurer une densité photonique élevée pour encourager le phénomène deux-photons à se produire. Dans le cas de ce projet, la source utilisée est un laser pulsé à 80 MHz effectuant des pulses de l'ordre de la centaine de femtosecondes (Insight DS+). Déployant une puissance d'environ 1W et accordable entre les longueurs d'onde de 680 nm et 1300 nm, ce laser comporte un module de compensation pour la dispersion. Cette puissance doit être contrôlée pour éviter d'effectuer des dommages sur les tissus biologiques afin de se garder de dénaturer les molécules servant d'agents de contraste (photoblanchiment) et pour empêcher la saturation de signal au niveau de la PMT. Pour y arriver, un modèle d'extinction d'intensité de Béer-Lambert est inversement appliqué à la profondeur dans les tissus à laquelle on effectue une image.

Le contrôle de la puissance s'effectue à l'aide d'une lame demi-onde (AHWP05M-980, Thorlabs) et d'un séparateur de polarisation (CCM1-PBS252, Thorlabs). En imposant un angle à la lame, la polarisation du faisceau laser effectuera une rotation et il est possible de gérer la quantité de lumière transmise par le cube polarisant. La lumière rejetée est dirigée vers une trappe de lumière (BT610, Thorlabs) (voir Figure 3.4) pour visualisation.

Un phénomène dont on doit tenir compte lors de l'utilisation de laser à brève impulsion est la dispersion de vitesse de groupe. Cette dispersion correspond à l'élargissement temporel de l'impulsion laser. En effet, lors du passage des impulsions laser dans des matériaux optiques tels que des lentilles ou des objectifs de microscope, la présence de plusieurs longueurs d'onde différentes cause un étalement spatial du pulse. Puisque l'indice de réfraction des pièces d'optique change selon la longueur d'onde, chacune voyage à une vitesse différente dans le matériel. Ce phénomène cause une seconde transformation sur l'impulsion appelé *chirp*. Ainsi, une elongation temporelle cause une translation des longueurs d'onde dans cette même impulsion laser. Il est important de corriger cet effet afin d'assurer que l'impulsion laser arrive avec une durée temporelle minimale à la fin de l'objectif du microscope pour optimiser l'effet de l'absorption deux-photons à se produire. Pour y parvenir, le laser détient un compresseur d'impulsion imposant un *chirp* négatif, corrigeant ainsi le phénomène d'étalement causé par le parcours optique.

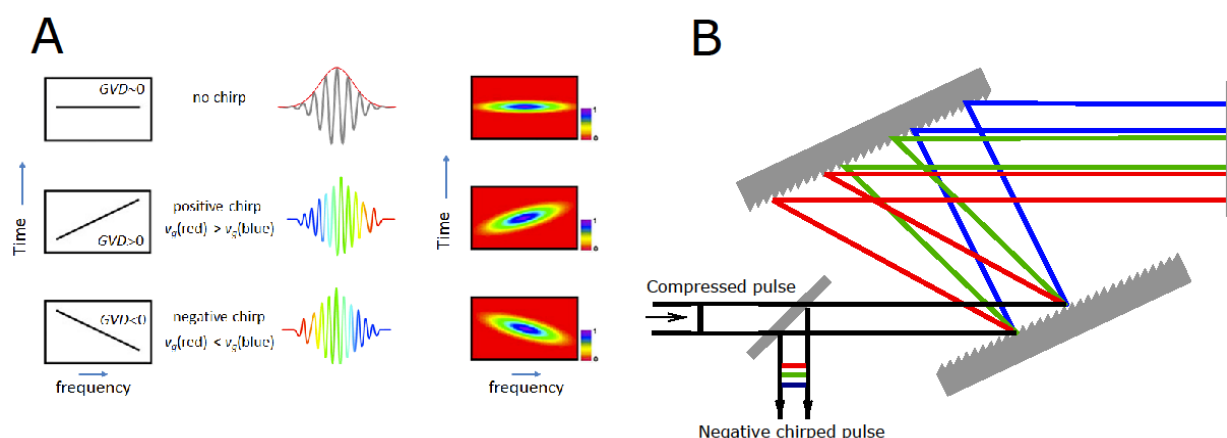


Figure 3.1 : Compensation de la dispersion. Afin d'assurer un pulse compressé maximal, on impose un *chirp* négatif corrigeant l'effet dans le parcours optique. En A, visualisation de l'effet de *chirping*. On peut observer comment la longueur d'onde centrale est changeante dans la forme du pulse et l'élongation temporelle associée. En B, un exemple d'un compresseur d'impulsion laser appliqué à un pulse précompressé. Le résultat est une impulsion laser avec un effet de *chirp* négatif. Adaptation de (Sood, n.d.; Strickland & Mourou, 1985).

Afin d'obtenir la résolution maximale que le système peut procurer, il est important que le faisceau laser soit de diamètre égal ou plus grand que la pupille de l'objectif d'imagerie qui est un XLFluor Olympus 4x avec une ouverture numérique (NA) de 0.28. Cette pièce ayant une ouverture arrière d'un diamètre de $\sim 35\text{mm}$ doit être remplie à partir d'un faisceau laser ayant un diamètre de $\sim 1\text{mm}$.

Il est alors nécessaire d'utiliser un parcours optique causant un agrandissement de la source laser. Pour y arriver, deux télescopes d'expansion sont utilisés. Le premier, étant de style galiléen, comprend une lentille divergente (-25mm, LC1054, Thorlabs) et une lentille convergente (100mm, LA1207-B, Thorlabs) offrant un grossissement de facteur 4. Le second est à la suite du système de balayage et se compose d'un objectif à balayage (WD=42.3mm, LSM04-BB, Thorlabs) et d'une lentille d'un diamètre de deux pouces (400mm, AC508-400-B-ML, Thorlabs) offrant un grossissement d'un facteur 9.5 portant le diamètre final du faisceau de lumière à 38 mm de diamètre.

Suite au premier grossissement, le faisceau laser est amené au système de balayage consistant en deux miroirs galvanométriques ou galvos (GVS002, Thorlabs). Un problème pouvant survenir avec l'utilisation de ces miroirs est le phénomène de marche du point focal. En effet, puisque le système conventionnel de balayage ne comprend que deux miroirs, la distance de travail du microscope est habituellement située entre ces deux miroirs causant un déplacement du point focal durant le balayage. Pour répondre à ce problème, deux lentilles convergentes (25.4mm, AC254-030-B, Thorlabs) sont placées entre les galvos afin de conserver les points focaux sur la surface des miroirs de balayage.

Ces miroirs sont opérés par des signaux venant de l'ordinateur. Ces signaux étant une succession de rampes de voltage contiennent un signal pour l'axe rapide et un pour l'axe lent. Leur orientation est dictée par le voltage permettant une rotation d'une valeur de 2° par volt. Cependant, cette orientation doit être corrigée pour le parcours optique qu'effectue le laser dans le microscope.

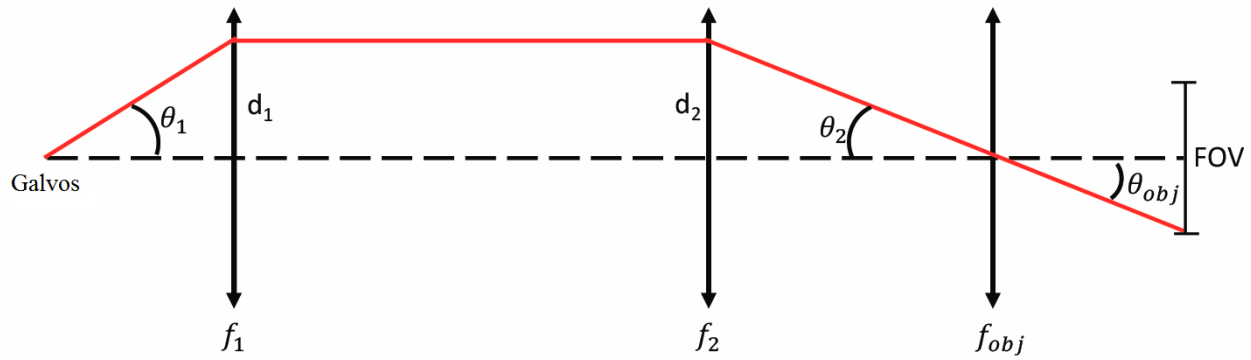


Figure 3.2 : Correction de l'angle des miroirs galvanométriques. Afin d'opérer les galvos, on doit calculer l'angle correspondant au champ de vue désiré dans le microscope. θ_1 : Angle du miroir galvanométrique. d_1 , d_2 : Distance du faisceau laser de l'axe optique. f_1 , f_2 : Distance focale des lentilles. θ_2 : Angle d'incidence dans l'ouverture arrière de l'objectif. θ_{obj} : Angle d'incidence suite à l'objectif. FOV : champ de vue du microscope. Adapté de (CASTONGUAY, 2017)

Afin de connaître la transformation nécessaire pour passer de l'angle des galvos au champ de vue de l'objectif, la trigonométrie viendra en aide. En sachant que les distances d_1 et d_2 sont équivalentes, il est possible de poser :

$$f_1 \tan(\theta_1) = f_2 \tan(\theta_2) \quad (3.1)$$

Dans le cas particulier où l'angle d'entrée coïncide avec l'axe optique, l'angle de sortie s'en trouve inchangé.

$$\tan(\theta_2) = \tan(\theta_{obj}) = \frac{FOV}{2f_{obj}} \quad (3.2)$$

En combinant les deux équations pour mettre en relation l'angle des galvos et le champ de vue voulu, on obtient :

$$\theta_1 = \arctan\left(\frac{FOV * f_2}{2f_{obj} * f_1}\right) \quad (3.3)$$

Alors, pour un champ de vue de 1.5 mm par 1.5 mm avec un objectif 4x d'une longueur focale de 29.5mm, f_2 égalant 400 mm et f_1 étant 42.3 mm, on doit balayer un domaine angulaire allant de 6.842° jusqu'à -6.842°.

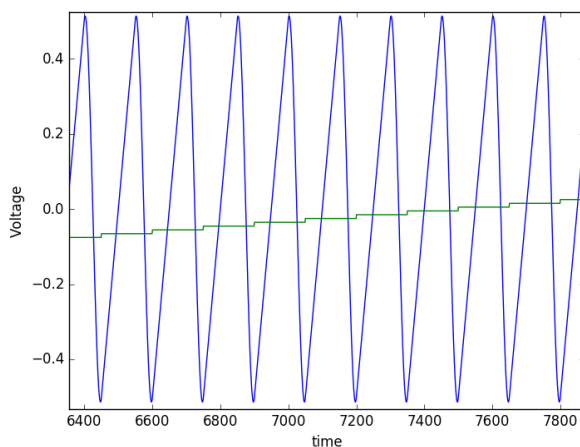


Figure 3.3 : Voltage envoyé aux galvos. L'axe rapide (bleu) est balayé sur l'entièreté de son domaine par un miroir galvanométrique durant que le second miroir (vert) est fixe afin d'imager une rangée dans l'espace de l'image. L'acquisition faite par la PMT qui enregistre à une fréquence synchronisée avec le nombre de pixels que l'on désire dans l'image.

Afin de permettre le contrôle de l'échantillon sous le microscope, une plateforme de déplacement d'échantillon a été conçue. L'annexion de 2 stages linéaires (Zaber T-Series LSR150B) et d'un stage vertical motorisé (MLJ050, Thorlabs) forme un système pouvant se déplacer dans les trois dimensions de l'espace. De plus, l'objectif du microscope est installé sur un stage linéaire placé parallèlement à l'axe optique. Cette installation supplémentaire permettra au système de contrôler la profondeur du plan d'imagerie dans le tissu biologique. De plus, un bassin de dimensions (20 x 15 x 10) cm est annexé sur le dessus de cette plateforme. L'utilisation de cette plateforme est décrite plus en détail dans la section 3.1.1.

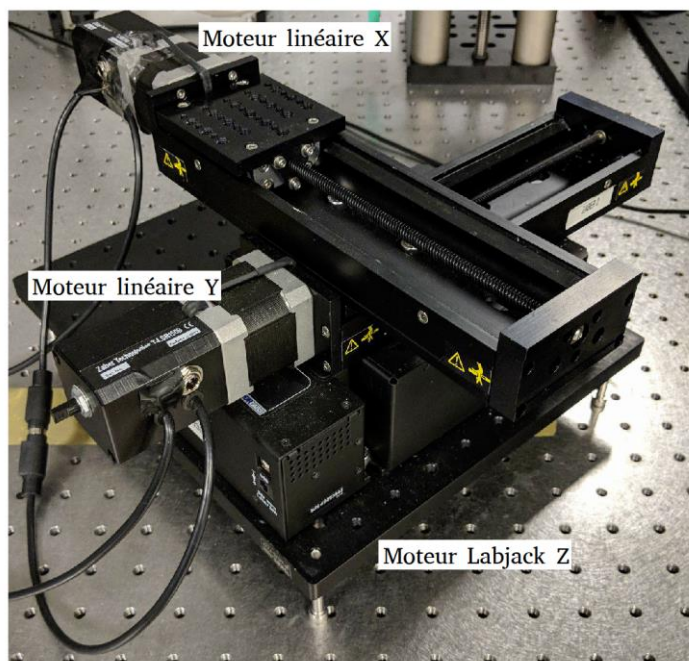


Figure 3.4 : Plateforme de déplacement. La combinaison de deux stages linéaires orthogonaux et d'un stage vertical motorisé permet le déplacement d'un échantillon dans les trois dimensions de l'espace. Non montré dans cette image, un bassin est annexé sur le dessus du moteur linéaire X.

Un parcours optique différent est utilisé pour la détection de la fluorescence. Au niveau de l'ouverture arrière de l'objectif, l'ajout d'un filtre dichroïque avec une séparation à 700 nm permet au système de diriger le signal de fluorescence vers la PMT. Pour assurer un bon filtrage de la lumière atteignant la PMT, un filtre optique passe-bande de 500 à 550nm est placé dans le parcours optique (ET525/50M-2P, Chroma Technology).

De plus, une chambre d'immersion a été conçue pour l'objectif du microscope. Composée sur la base du système de cage Thorlabs, un cylindre fileté est vissé dans un support de cage de 30 mm (CP06) et une fenêtre est installée à l'aide de résine polyépoxyde résistante à l'eau. Cette chambre est nécessaire puisque l'objectif 4x utilisé n'est pas un objectif à immersion. Cette mesure permet de ne pas compromettre la pièce d'optique et de réduire les déformations de longueur dans l'axe optique lors de l'imagerie.

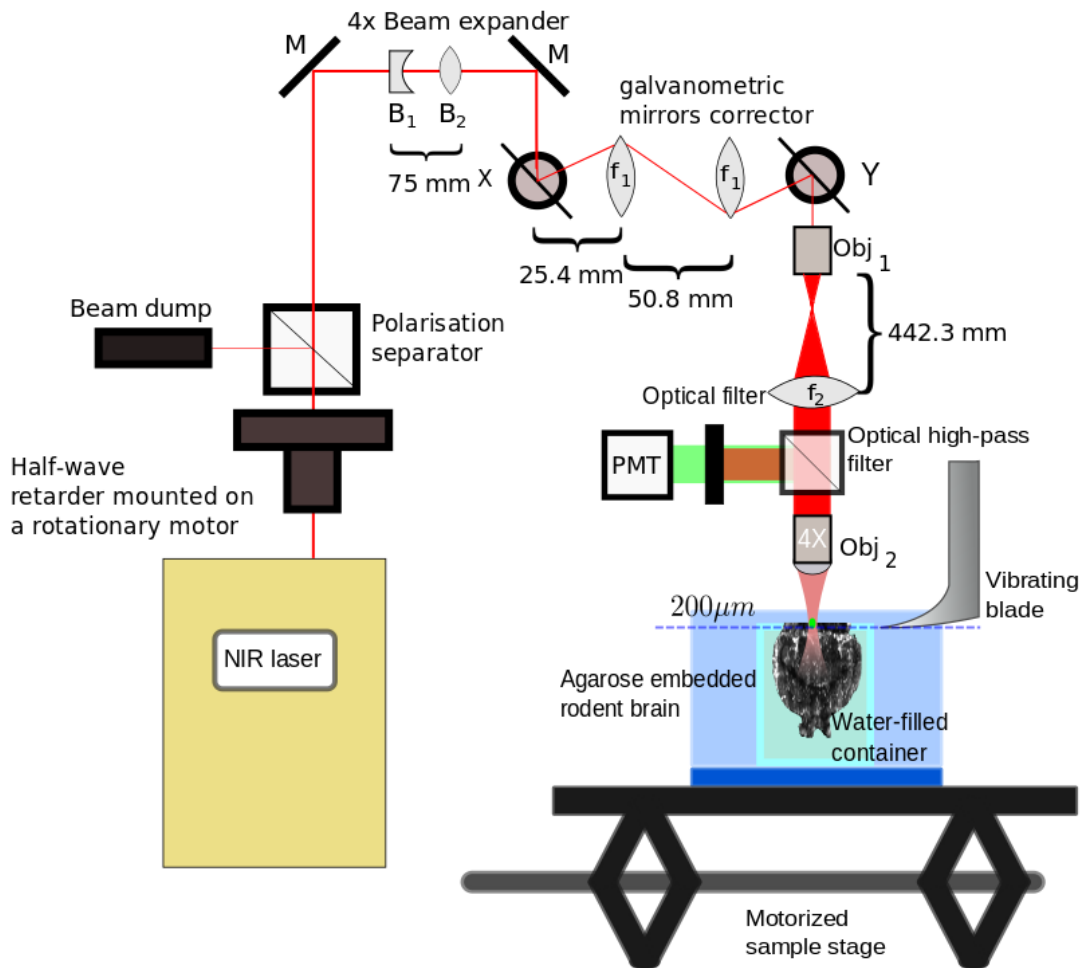


Figure 3.5 : Schéma du montage. En ordre, le parcours du laser comprend un régulateur de puissance, une première augmentation de diamètre d'un facteur 4, le passage dans le système de balayage corrigé par un télescope entre les galvos, un agrandissement supplémentaire du diamètre d'un facteur 10 et le passage dans l'objectif jusqu'à l'échantillon. Le retour de la lumière est capturé par le même objectif et redirigé par un filtre optique passe-haut vers la PMT. Image provenant de l'article publié.

3.1.1 Caractérisation du microscope

La PSF du microscope doit être caractérisée afin d'obtenir une idée des paramètres d'imagerie à utiliser. En théorie, la section transversale de la PSF d'un microscope, comme mentionné au chapitre 2, est représentée par les fonctions de Bessel de premier ordre (Zhang & Zerubia, 2007).

Ainsi, l'utilisation d'un profil Airy permet d'estimer théoriquement la largeur du faisceau laser en utilisant la formule suivante pour la PSF:

$$h(\rho) = \left[2 \left(\frac{J_1(c\rho)}{c\rho} \right) \right]^4 \quad (3.4)$$

où ρ est le rayon en coordonnées cylindriques, c est défini comme le nombre d'onde k multiplié par l'ouverture numérique et h est la fonction d'Airy. La microscopie deux-photons impose une PSF au carré, ce qui explique l'exposant d'un facteur 4. On recherche la largeur à 10% de la hauteur, car nous utiliserons ce critère lors de la caractérisation pratique. En changeant les variables $c\rho$ par x et en imposant une valeur h de 0.1, on trouve l'équation transcendante suivante :

$$0.2811x = J_1(x) \quad (3.5)$$

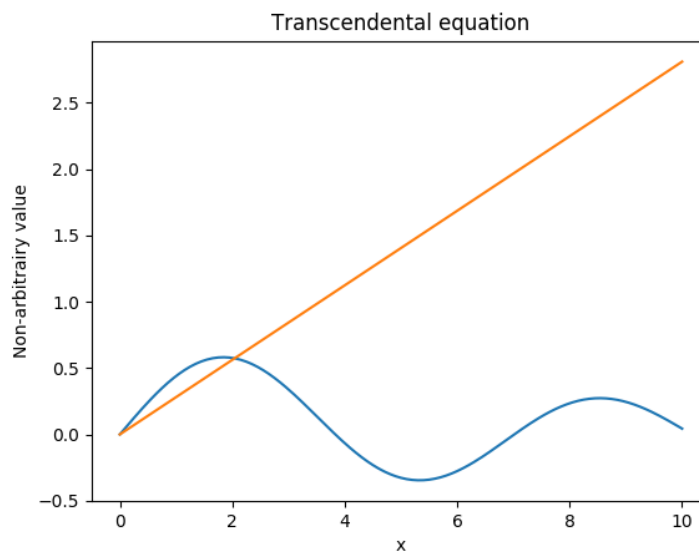


Figure 3.6 : Équation transcendente pour l'équation 3.5. Graphiquement, la méthode de résolution se limite à trouver la première racine dépassant la réponse triviale $x = 0$. Dans ce cas-ci, la première racine est $x \approx 2.0405$.

Par la suite, on retransforme x par cp et on isole ρ et on insère les paramètres utilisés dans le montage, $NA = 0.28$ et $\lambda = 800\text{nm}$:

$$\rho = \frac{2.0405 * \lambda}{2\pi * NA} \approx 0.9 \mu m \quad (3.5)$$

En multipliant cette valeur par 2, on trouve un diamètre théorique de 1.8 μm .

Afin de caractériser la section transversale du microscope au plan d'imagerie, la fonction d'étalement de bordure (ESF) est utilisée en imageant une cible de résolution USAF 1951 (R3L3S1N). La méthode ESF est choisie, car la puissance du laser sur la cible pourrait causer des dommages et une conservation des groupes de haute fréquence spatiale était désirée. Ainsi, avec l'utilisation des premiers groupes, la technique permet de réduire les risques de détérioration de la cible. Cette méthode consiste à imager la bordure d'un objet droit et d'observer la réponse du microscope. En théorie, l'échantillon est représentable par une fonction marche. Cependant, la réponse du microscope étalera l'image obtenue par convolution de la réponse sur l'objet. La convention utilisée pour caractériser la ESF est de repérer les points à 10% et 90% du signal maximal et de mesurer la distance entre ceux-ci (Wang, 2007). Suite à l'expérience, nous trouvons une ESF d'une grandeur de $\sim 2 \mu m$ ce qui représente un espacement de 10% avec la valeur théorique attendue.

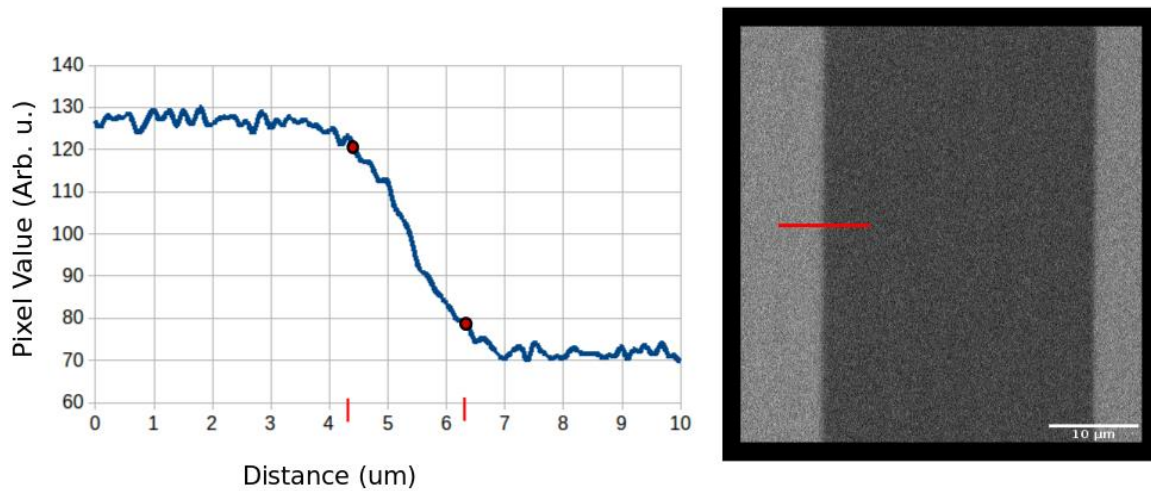


Figure 3.7 : Résolution latérale. Sur la droite, image du microscope observant l'espace interbande entre deux bandes d'oxyde de titane sur la cible USAF 1951. La ligne rouge représente l'endroit où l'ESF fut caractérisé. Sur la gauche, on observe la descente de signal et les points d'intensité à 10% et 90% sont représentés par les points rouges. On observe alors une réponse avec un diamètre de ~2 um.

Puisque l'axe perpendiculaire à l'axe optique a été caractérisé, il faut analyser la réponse du microscope dans l'axe optique. Pour y parvenir, on utilise des billes fluorescentes d'un diamètre de 4 um fixées dans une céramique diélectrique (FocalCheck test slide #1, Thermo Fisher Scientific) et on effectue un survol de l'échantillon à différentes profondeurs. Dans ce cas-ci, un balayage de 100 um a été effectué avec des déplacements consécutifs de 1 um. Les résultats sont présentés à la figure 3.8. Pour fin de comparaison, la valeur théorique a été estimée par la longueur de Rayleigh 'Z' en utilisant une ceinture du faisceau gaussien de 1.8 um. La valeur trouvée est de 25.44 um qui représente bien la valeur expérimentale.

$$Z = \frac{2\pi * \omega_o^2}{\lambda} \approx 25.44 \mu m \quad (3.6)$$

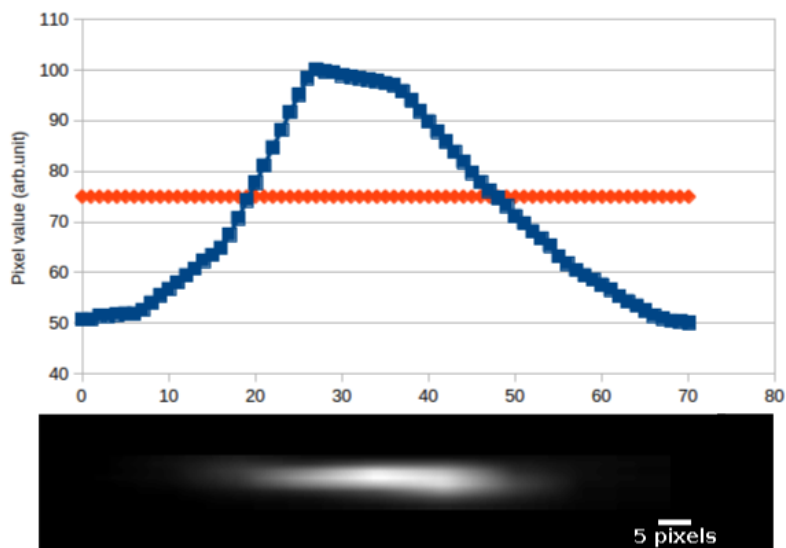


Figure 3.8 : Caractérisation de la PSF dans l'axe optique. La courbe bleue représente l'intensité lumineuse de la fonction de réponse de la bille fluorescente. La courbe orange est fixe à 50% du signal maximal. En dessous, une image de la PSF procurée par le microscope. La distance calculée est d'environ 25.5 μm .

Il est important de rappeler que cette caractérisation est dans une situation parfaite. Lors du passage de la lumière dans les objectifs jusqu'à la surface du tissu, plusieurs facteurs influenceront la forme de la PSF. D'abord, la chambre d'immersion située après l'objectif cause des aberrations circulaires puisque le passage de l'air à l'eau passant par la fenêtre n'est pas avec une source de lumière collimatée. Afin d'estimer les aberrations lors d'acquisitions d'échantillons biologiques, on peut modéliser le déplacement des rayons lumineux avec le programme Zemax.

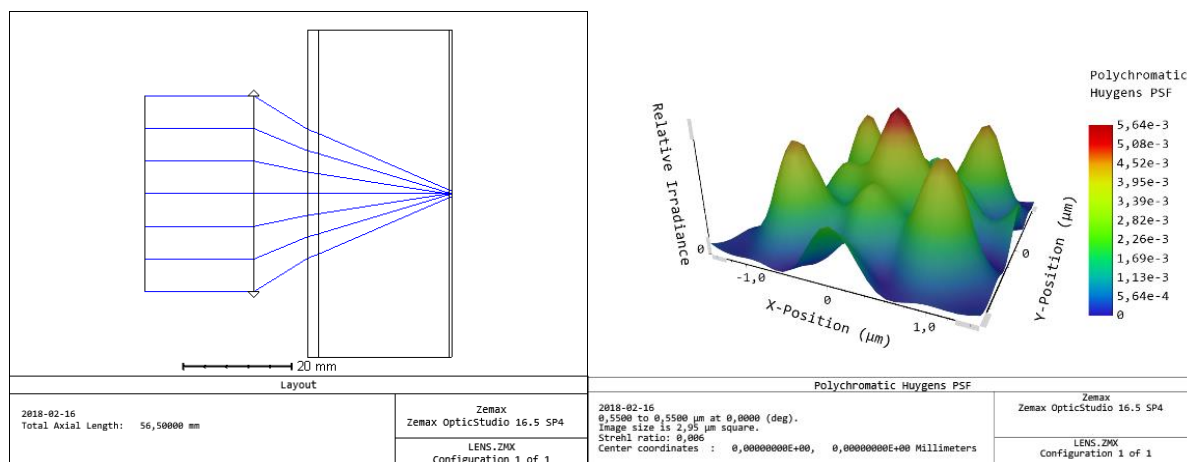


Figure 3.9 : Modélisation Zemax. On simule l'objectif du microscope comme une lentille parfaite 4x. Le trajet optique traverse une épaisseur de lame de 2 mm ($n = 1.55$), de l'eau pendant 24 mm ($n=1.33$) et une épaisseur de 500 μm de tissu biologique ($n=1.37$) (Zhou, Chan, Lai, & Tang, 2013). On observe la dégradation de la PSF par les aberrations sphériques causées par les changements de milieux.

De plus, un phénomène physique supplémentaire a lieu qui dégrade aussi la PSF. Ce phénomène appelé diffusion est la conséquence d'un milieu de réfraction hétérogène sur un faisceau de lumière. Le résultat correspond à un agrandissement de la PSF. Or, ces différents processus physiques causent une dégradation de la PSF et les mesures d'ESF et de PSF sont plus étendues que lorsque l'image est acquise dans un tissu biologique.

3.2 Préparation des échantillons

Afin d'effectuer cette recherche, l'utilisation d'échantillons murins a été acceptée par le conseil de recherche de l'école Polytechnique Montréal et les manipulations des échantillons ont suivi les directives de l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM).

3.2.1 Échantillons murins

Comme précédemment expliqué, les échantillons murins utilisés dans cette expérience ont été fournis avec la collaboration de Dr. Bernard Lévy. Les animaux observés sont descendants des souris mâles ayant les gènes APP et PS1 ayant été achetés d'Einzelhandelsfirma Kösler (Rottenburg, Allemagne). Les souris achetées, âgées de 7 semaines, ont été élevées en captivité dans une salle à température contrôlée (21 °C - 22 °C) et avaient accès libre à de la nourriture et de l'eau. Ces mâles se sont accouplés à des femelles de génotype C57BL6/J achetées de Harlan Laboratories B.V. (Venray, Pays-Bas). Une biopsie au niveau de la queue a été effectuée pour identifier le génotype de la descendance et les mâles APP/PS1 ont été comparés aux mâles C57BL/6J. Les procédures animalières ont été approuvées aussi par le comité d'éthique Villemin pour les expérimentations animales (numéro de protocole CEEALV/2012-12-02) (Cifuentes et al., 2015).

3.2.2 Perfusion des échantillons et protocole

Afin de cartographier le système vasculaire sanguin dans les échantillons de cerveau, le volume sanguin doit préalablement être rempli d'un agent de contraste fixé à l'intérieur du système sanguin. Pour ce faire, une anesthésie de la souris est effectuée avec de l'isoflurane 2%. Par la suite, une chirurgie terminale est effectuée pour transfuser au niveau de l'apex du cœur 30 ml de solution tampon (PBS 1x) avec un débit de 0.3ml/min. Une seconde injection de 30 ml solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% est ensuite insérée dans le système sanguin au même débit. Un perfusé contenant 1% de l'albumine étiquetée avec de la Fluorescéine (FITC) (A9771, Sigma), 2% de gélatine de peau porcine de type A (G1890, Sigma) est ensuite perfusé. Le corps de la souris est positionné avec un angle de 30 degrés avec la tête pointant vers le bas. Vers la fin de la perfusion, la submersion de la tête de la souris est effectuée dans un bassin de glace afin d'assurer la solidification du gel dans les vaisseaux sanguins. Suite au protocole, 15 minutes d'attente sont effectuées et le cerveau est chirurgicalement retiré.

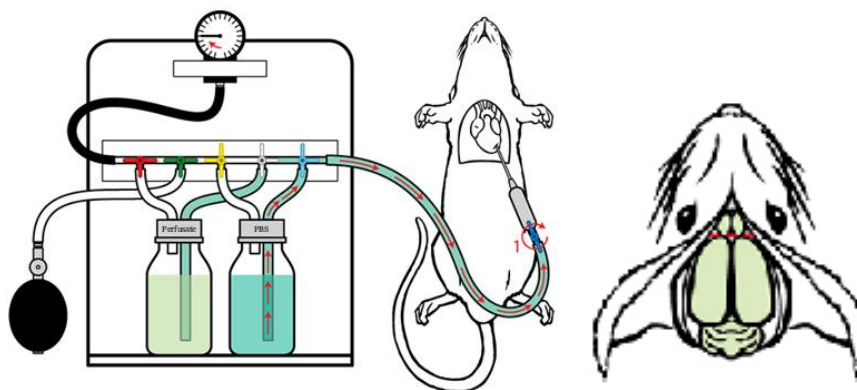


Figure 3.10: Perfusion des échantillons (gauche). Chirurgie permettant l'acquisition de l'échantillon préparé (droite). Dans le cas de ce projet, le laboratoire de Dr. Bernard Lévy a effectué la perfusion et la cueillette suivant ce protocole. Images adaptées de (Gage, Kipke, & Shain, 2012)

3.2.3 Préparations des échantillons pour fin d'imagerie sérielle

Afin d'utiliser le microscope et d'imager en coupe successive l'échantillon désiré, la fixation du tissu dans une matrice pour le maintien doit être effectuée. Contrairement à d'autres techniques comme la cryocongélation ou la déshydratation, le style d'ancrage présenté réduit le stress imposé sur les tissus.

Un mélange d'agarose 4%, de 0.2139g de sodium periodate (NaIO_4) et de 60 ml d'eau distillée est agité pendant 2 heures à température pièce. Par la suite, trois rinçages avec une solution tampon à base de phosphate (PBS 1x) sont effectués en s'assurant que la concentration finale d'agarose oxydée reste proche de 4%. La méthode de rinçage consiste à laisser décanter et sédimenter la solution et l'utilisation d'une pipette est requise pour retirer le liquide en surface de la sédimentation. Cette solution est utilisée comme médium dans lequel le tissu sera fixé et permettra un contrôle accru sur les coupes de l'échantillon par le vibratome. Pour permettre l'enrobage, on doit porter l'agarose à environ 45°C pour provoquer la dissolution de l'agarose dans le solvant. L'agitation de la solution est nécessaire lors du chauffage. Lorsque la solution devient transparente, elle peut être versée dans un moule contenant l'échantillon. Par la suite, une oxydation est effectuée dans une solution de sodium borohydrate (1%) pendant 2 heures à température pièce. Cette technique chimique permet une fixation supplémentaire à l'interface entre l'agarose et les tissus étudiés.

Afin de rendre l'ancrage possible, un moule a été conçu et fabriqué à l'aide d'une imprimante 3D. Ce moule d'une taille optimisée pour la grandeur de tissus murins est utilisé pour maintenir l'agarose versée et de maintenir la solution jusqu'au refroidissement à température pièce. Ce moule comporte deux pièces, constitué d'une paroi cylindrique et d'un fond gravé afin de maintenir l'agarose solidifiée en place sur la plateforme. Les deux pièces sont maintenues ensemble par un ruban adhésif pendant le refroidissement. Le cerveau est maintenu en suspension dans le volume cylindrique par un crochet constitué d'une seringue recourbée qui est plantée au niveau du tronc cérébral de l'organe. Cette procédure assure une orientation répétable entre les acquisitions durant l'imagerie.



Figure 3.11 : Module de fixation de l'échantillon dans l'agarose. Un crochet maintient l'échantillon à la verticale pendant le refroidissement de l'agarose. Le crochet est planté dans une partie non imagée de l'échantillon, ici le tronc cérébral. Suite à l'ancrage, le crochet et la partie cylindrique sont retirés.

3.3 Design du vibratome

La microscopie deux-photons permet d'imager un échantillon biologique sur quelques centaines de micromètres de profondeur dépendant de la puissance du laser utilisé. Cependant, en dehors de cette plage, la résolution est amoindrie par les phénomènes de diffusion et d'absorption intrinsèque aux tissus biologiques. Afin de dépasser cette profondeur, une technique de sectionnement est

utilisée pour révéler une nouvelle surface. Pour le montage de ce projet, un trancheur à lame vibrante (*vibratome*) a été fabriqué pour couper des tranches épaisses de tissus.

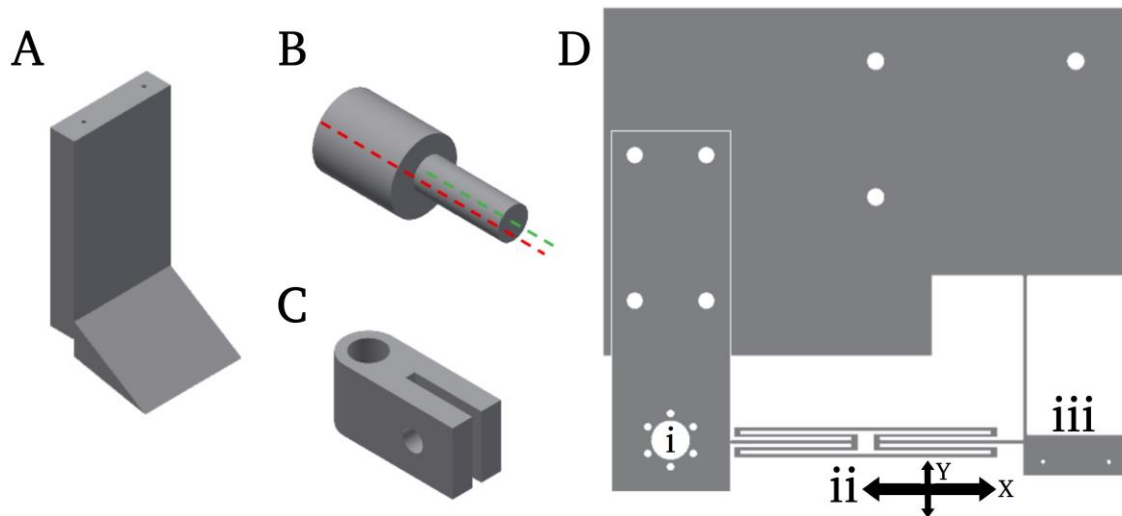


Figure 3.12 : Parties du vibratome. A : Support de lame. Ce support est fixé à l'aide de vis à l'embout iii de la pièce D. Deux encoches taraudées sous la pièce permettent la fixation d'une lame de rasoir comme outils de coupe. B : Arbre décentré. En rouge, l'axe de rotation du moteur rotatif est décentré de 800 μm par rapport au centre du pied de l'arbre en vert. C : Joint de connexion entre la pièce ii et B. D : Base de support en aluminium. Au point i, le moteur rotatif avec l'arbre décentré est fixé. La rigidité des pièces ii et iii est telle que le mouvement horizontal est préférentiel au point iii causant le mouvement de coupe. Adapté de (CASTONGUAY, 2017)

La pièce a été inspirée par le design présenté dans (Ragan et al., 2012). Cette pièce composée de quatre parties est fixée fermement à des poteaux de soutien localisés dans la chambre d'imagerie deux-photons. La figure 3.11 montre la configuration du vibratome. Le mouvement de coupe est généré par un moteur rotatif (Faulhaber, Micromotor 3863). Ce moteur est couplé avec la pièce C et est fixé à l'aide de vis au point (i). La pièce C comprend un manche désaxé de 800 μm par rapport au centre de rotation. Ainsi, le mouvement rotatif du moteur cause une rotation de 800 μm de rayon se transmettant à la pièce (ii). Cette pièce, recevant le mouvement rotatif, comprend deux axes de mouvement : x et y. Le design de cette pièce est tel que la rigidité dans l'axe x est plus importante que dans l'axe y permettant un transfert du mouvement préférentiel dans cet axe de mouvement. La pièce iii détient une rigidité plus importante dans l'axe y que l'axe x, permettant un transfert efficace du mouvement de la pièce ii afin d'effectuer le mouvement de coupe.

Pour permettre la coupe de l'échantillon, le moteur rotatif est activé avec une fréquence de rotation de 60 Hz causant un mouvement linéaire d'une amplitude de 1.6 millimètres en translation de la lame de rasoir annexée. L'utilisation de moteurs linéaires est nécessaire afin de déplacer l'échantillon sur la lame de rasoir avec une vitesse de 1mm/s dans l'axe y.

Afin de numériser tout l'échantillon, une méthode d'acquisition doit être mise en place. Puisque l'on connaît le fonctionnement de la technique d'imagerie par fluorescence deux-photons, que la préparation des échantillons a été démontrée, que le fonctionnement des miroirs galvanométriques et de la PMT ont été introduits et que la plateforme d'imagerie a été présentée, une exposition de la séquence d'imagerie suit.

Précédent la séquence d'imagerie, quelques préparations doivent être effectuées. L'échantillon étudié doit être préparé et fixé dans l'agarose comme expliqué dans la section 3.2. Le bloc d'agarose doit être extrait du moule d'agarose. Cependant, la base du bloc d'agarose doit rester enracinée dans la base du moule de fixation. La paroi cylindrique est ensuite collée sur le dessous de la base du moule. Cette procédure doit être effectuée afin de surélever l'échantillon dans le bassin. Au fond du bassin, un socle permet l'imbrication de la paroi cylindrique et ce socle est maintenu par de la colle chaude afin d'assurer une reproductibilité de l'emplacement de l'échantillon dans le bassin. Une fois le bloc d'agarose placé, l'utilisateur du système verse ensuite de l'eau dans le bassin jusqu'à ce que l'échantillon soit submergé. Par la suite, le support de lame équipé d'une lame de rasoir est mis en place et fermement vissé à la pièce support. Pour éviter des débordements de liquide causés par l'objectif plongeant dans le bassin, un siphon est placé afin de retirer l'excédent d'eau dépassant une certaine hauteur. De plus, cette manœuvre permet d'éviter le risque que l'eau submerge totalement la chambre d'immersion et cause une accumulation de liquide pouvant résulter à des artefacts ou à une perte de résolution.

Les préparations étant terminées, l'utilisateur peut faire des coupes afin de révéler la surface de l'échantillon dans l'agarose et cette première surface sera le début de l'acquisition. Sachant que le vibratome conserve la même position dans l'espace et que l'échantillon est fixe sur la plateforme, tous les paramètres d'imagerie sont préétablis. On sélectionne d'abord la surface totale que le microscope devra parcourir en lisant les valeurs de position des moteurs Zaber au coin supérieur gauche (*top left*) et au coin inférieur droit (*bottom right*). Ces points seuls permettent de construire la grille de positions qui assurera un déplacement de 1.2 mm entre chaque image. Ce déplacement

est sélectionné afin d'assurer une superposition de 20% sur les bordures du champ de vue du microscope étant de 1.5 mm x 1.5 mm. Ce protocole permettra d'assurer une continuité dans la reconstitution grand-champ comme expliquée dans la section 3.4.1. On préétablit une épaisseur de coupe de 200µm. Pour y parvenir, entre chaque acquisition, le moteur *Labjack* effectue une ascension de l'épaisseur choisie, le vibratome se met en marche et le moteur *Zaber* situé dans l'axe de coupe s'active pour permettre la coupe de l'échantillon. De plus, pour localiser les tuiles d'image, les acquisitions sont sauvegardées en format Nifti compressé et le nom des fichiers contient les coordonnées de la tuile comme suit :

Channel1_nx_XX_ny_YY_slice_ZZ.nii.gz

où XX, YY et ZZ sont remplacées respectivement par la position horizontale, verticale et l'index de la tranche. Cette indexation permet de repérer les tuiles nécessaires lors de la reconstruction grand-champ.

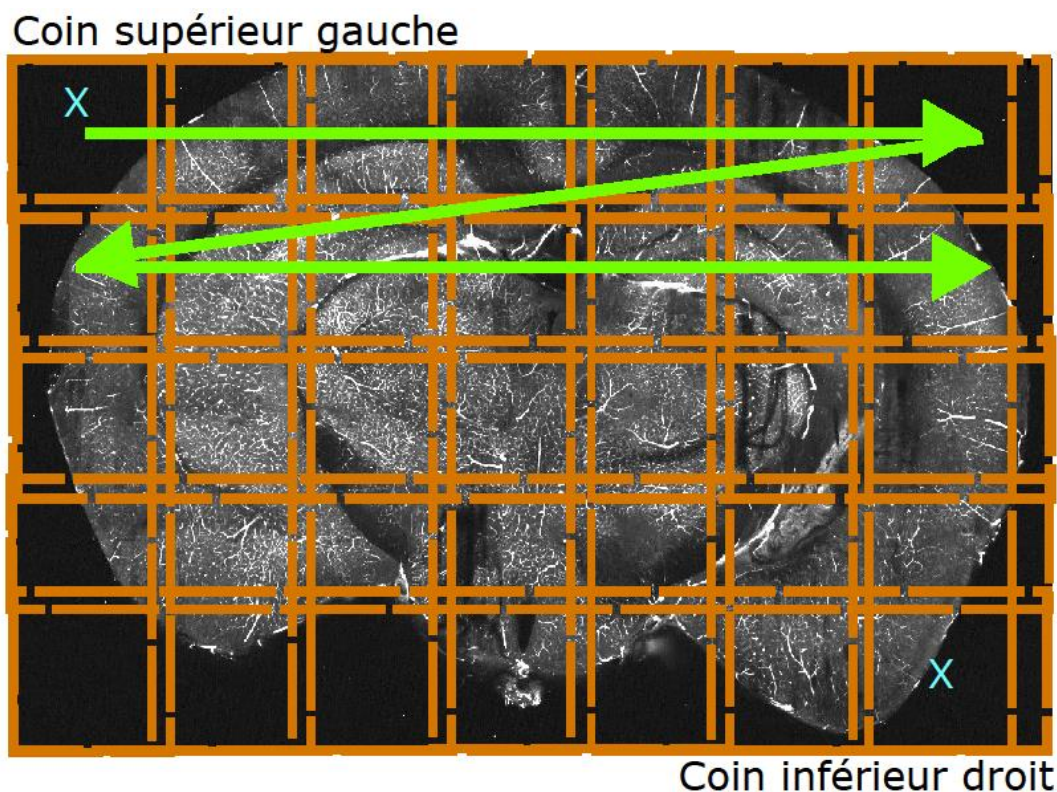


Figure 3.13 : Schéma d'acquisition. Lorsque le coin inférieur droit et le coin supérieur gauche sont définis par l'utilisateur (croix bleutées), l'acquisition automatique des volumes peut être démarrée. Le recouvrement des tuiles montré dans l'image permet de faciliter l'assemblage lors de la reconstruction.

Lors de l'acquisition, il est difficile d'assurer une coupe parallèle à la plateforme par le vibratome. Ceci peut engendrer des complications dans l'acquisition pouvant causer une perte de données significative. Pour y remédier, un algorithme de détection de surface a été implémenté dans le système de contrôle du microscope. Afin de caractériser le plan de coupe, des acquisitions sont prises à différentes hauteurs pendant que la plateforme est immobile. Les images sont acquises aux points définis pour le stage linéaire Zaber. De cette façon, il est possible de trouver le signal maximal en tout point sur la grille de déplacement et de modéliser un plan afin de diriger l'acquisition et d'optimiser la fenêtre de profondeurs à acquérir. Ces points maximaux sont ensuite utilisés comme référence par laquelle l'acquisition de l'image est effectuée. On utilise des déplacements de 50 μm dans l'axe optique entre chaque image afin de limiter l'information mutuelle entre deux acquisitions subséquentes. Par la suite, on amorce chaque séquence d'imagerie avec une distance de 150 μm au-dessus du plan de coupe modulé et on fait l'acquisition de 8 images (400 μm) afin d'assurer une profondeur d'imagerie de 250 μm dans l'échantillon.

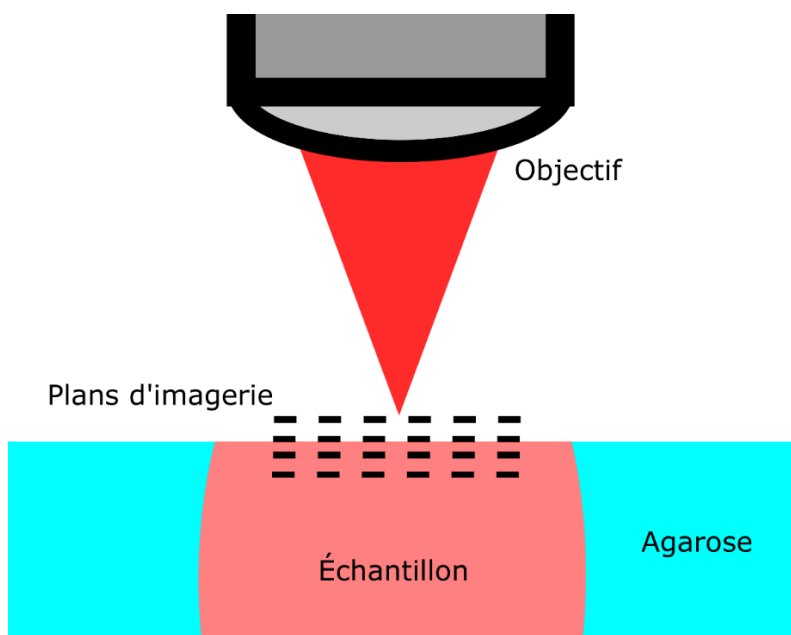


Figure 3.14 : Détection du plan de coupe. Chaque position définie pour l'acquisition est pré-échantillonnée à différent plan d'imagerie à l'aide d'un moteur linéaire contrôlant la position de l'objectif du microscope. Un traitement de signal identifie les points d'intensité maximale et un plan est paramétré sur les points optimaux.

3.4 Traitement des données

Après l'acquisition et l'optimisation, des traitements numériques doivent être appliqués afin de reconstruire les images et d'assurer une continuité histologique permettant de bien observer la capillarité sanguine de l'échantillon. Le processus de segmentation doit aussi être appliqué pour permettre le dénombrement et la caractérisation des vaisseaux sanguins. Par la suite, on désire segmenter différentes régions du cerveau murin afin d'observer les changements statistiques entre les différents groupes d'échantillons.

3.4.1 Reconstruction pour histologie grand-champs

Afin de reconstruire les tuiles d'imagerie, deux outils sont utilisés, la corrélation de phase et un algorithme utilisant la diffusion Laplace. La technique utilisée pour l'optimisation de superposition est une corrélation de phase croisée (Preibisch & Saalfeld, 2008). Cette technique repose sur l'information mutuelle entre deux images séparées par une translation. Le théorème de Fourier impose que deux images (A et B) séparées par une translation (x, y, z) contiennent de l'information mutuelle contenue dans la matrice de corrélation de phase Q :

$$Q(k, l, m) = \frac{B(k, l, m) \cdot A^*(k, l, m)}{|B(k, l, m) \cdot A^*(k, l, m)|} \quad (3.7)$$

où k, l et m sont les nombres d'onde correspondant aux longueurs x, y et z respectivement et que l'astérisque représente le conjugué complexe de l'image transformée. En général, cette matrice retransformée dans l'espace des coordonnées contient des réponses en forme de distribution de Dirac correspondant à la translation entre les deux images. Cependant, dans le cas de la microscopie, des aberrations ou autres défauts mineurs peuvent entraîner une résolution dégradée. De plus, la transformation de Fourier inverse de la matrice de corrélation de phase implique des symétries dans la réponse. Pour surmonter cette embûche, un modèle de déplacement des moteurs est généré afin d'estimer la position de chaque tuile dans la grille d'acquisition. Ainsi, en supposant la translation attendue entre deux images consécutives, la solution est sélectionnée dans le cadran de translation correspondant au problème. Par suite, un algorithme calculant la corrélation des deux images permet de sélectionner la meilleure translation possible afin de superposer les images.

Un mélange des images est nécessaire afin d'éviter du flou dans les structures histologiques. En effet, la superposition des images n'est pas toujours exacte. Afin de limiter les défauts, on définit la zone de superposition entre deux images comme étant le domaine où l'équation différentielle de diffusion linéaire de Laplace doit être résolue.

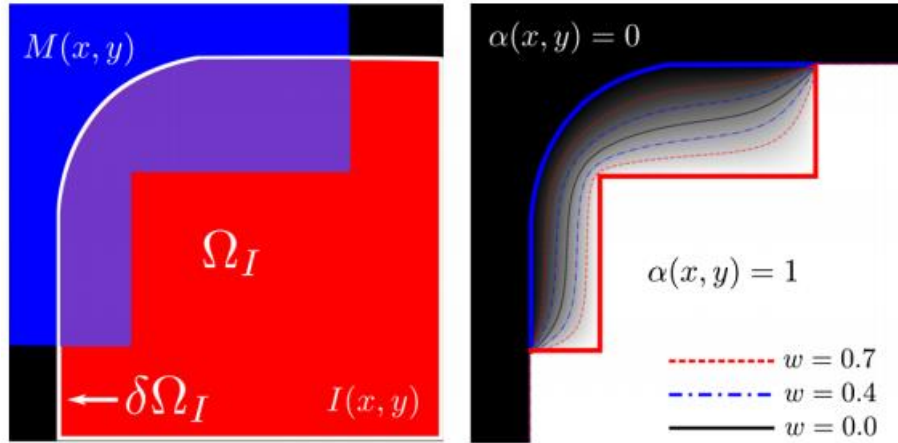


Figure 3.15 : Méthode d'assemblage. Le masque $M(x,y)$ en bleu est appliqué en bordure des tuiles d'imagerie $I(x,y)$. La zone de superposition en mauve contient deux frontières : $\delta\Omega_I$ démarquée en bleu et la frontière interne démarquée en rouge (image de droite). Un masque de valeur α allant de 0 à 1 est ensuite appliqué après la résolution à l'équation de Laplace. Un facteur w est utilisé afin de générer des bordures souples. Image tirée de (Lefebvre, Castonguay, Pouliot, Descoteaux, & Lesage, 2017).

Suite à la résolution, il est possible de modifier la zone de superposition en ajoutant un facteur w qui produit un masque modifié α' :

$$\alpha' = \begin{cases} 0, & \text{si } \alpha(x,y) < w/2 \\ 1, & \text{si } \alpha(x,y) > 1 - w/2 \\ \frac{\alpha(x,y) - w/2}{1 - w}, & \text{autrement} \end{cases} \quad (3.8)$$

Ce facteur ajouté assouplit la bordure d'assemblage et assure un meilleur fini de la reconstruction finale. Ainsi, en combinant ces deux outils, une reconstruction tuile par tuile optimisée et une diffusion d'intensité, la reconstruction grand-champ est effectuée et permet des images à haute résolution et à grand champ de vue.

3.4.2 Segmentation des vaisseaux sanguins

La segmentation des vaisseaux sanguins doit s'effectuer en plusieurs étapes. La difficulté de la segmentation du système sanguin est associée à la variété des diamètres des vaisseaux. Pour en segmenter la majorité, deux méthodes sont utilisées : un filtre de style Sato et l'application d'un seuil Otsu local. Un seuil local à deux classes a été utilisé dans ce cas présent pour assurer une segmentation des vaisseaux sanguins plus inclusive. L'utilisation de l'image reconstruite comme élément d'entrée de la fonction cause une segmentation favorisant les larges vaisseaux sanguins. La segmentation est donc appliquée suite à une ségrégation de l'image complète en multiple carré de dimension 1500×1500 pixels. Ce processus assure que les classes calculées par le filtre Otsu incorporent plus de vaisseaux sanguins.

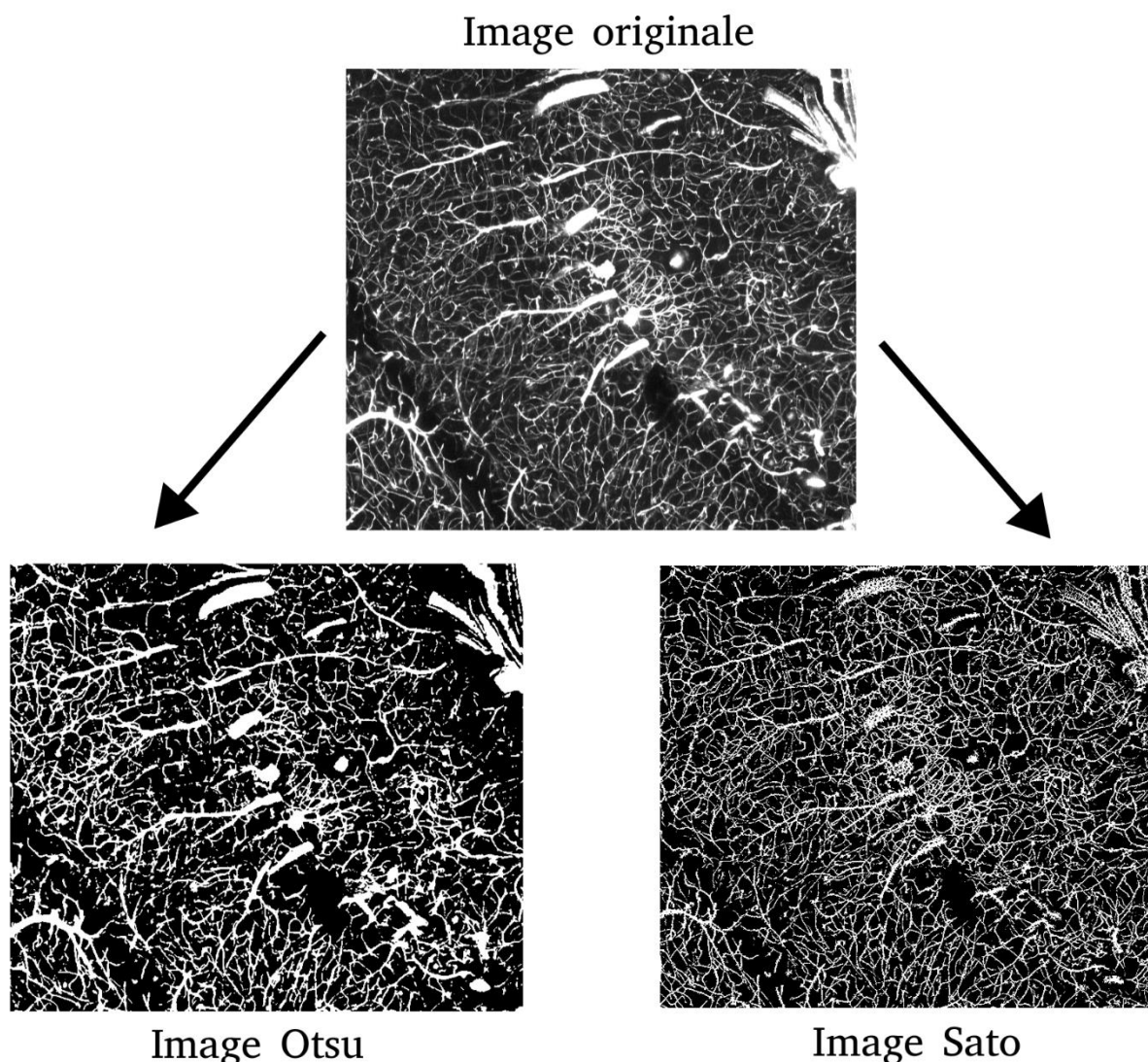


Figure 3.16 : Comparaison des techniques de segmentation. Une acquisition du microscope est segmentée par méthode Otsu et Sato. La méthode Otsu montre une segmentation complète des vaisseaux sanguins plus larges ($>15\mu\text{m}$), mais comprend une perte de petites structures proche des larges structures. Le filtre Sato démontre une bonne segmentation des petits vaisseaux sanguins. Pourtant, lors du traitement de larges structures, des filaments intra structure sont créés, car la méthode Sato repère mieux les structures avec de hautes fréquences spatiales.

L'addition de ces techniques est favorisée afin de segmenter deux groupes de vaisseaux différents : les vaisseaux de $15\mu\text{m}$ et moins et ceux de $15\mu\text{m}$ et plus. Cette distinction devient claire lorsqu'on regarde les résultats des deux techniques de segmentation. Lors de l'application du filtre Otsu local, les larges structures sont généralement bien segmentées au détriment des plus petites structures. Pour la segmentation des capillaires sanguins, l'application du filtre Sato permet de mettre en

évidence les petites structures de forme tubulaire dans une image. Lorsque les structures sont plus imposantes, des structures tubulaires sont mises en évidence à l'intérieur de celles-ci. C'est pourquoi l'addition de ces deux méthodes est utilisée afin de bien segmenter larges et petites structures.

Suite à la création de ce masque, nous voulons caractériser la morphologie des vaisseaux sanguins. La méthode utilisée est inspirée de (Tsai et al., 2009). Tout d'abord, on applique la squelettisation (Kirbas, C. Quek, 2004) sur le masque, ce qui aura pour effet de trouver la dorsale des structures sanguines. Pour ce faire, on utilise la librairie *Scipy.morphology* et le module *thin* dans un interpréteur Python. Ce module est un processus itératif d'érosion ne conservant que la structure minimale possible. Dans le cas de nos échantillons, on impose 150 itérations afin de s'assurer que seule la dorsale des vaisseaux sanguins est conservée. Parallèlement, on utilise le module *distance_transform_edt* qui est aussi un processus itératif d'érosion. Cependant, le résultat est renvoyé comme étant l'itération quand le pixel a été érodé. Ainsi, la dorsale de ce processus est multipliée avec la *transformée de distance* pour nous donner comme résultat final une carte squelettique des vaisseaux sanguins contenant comme valeur de pixels le rayon de ceux-ci. Ainsi, on peut observer le volume de toutes les structures sanguines en suivant un modèle de volume cylindrique.

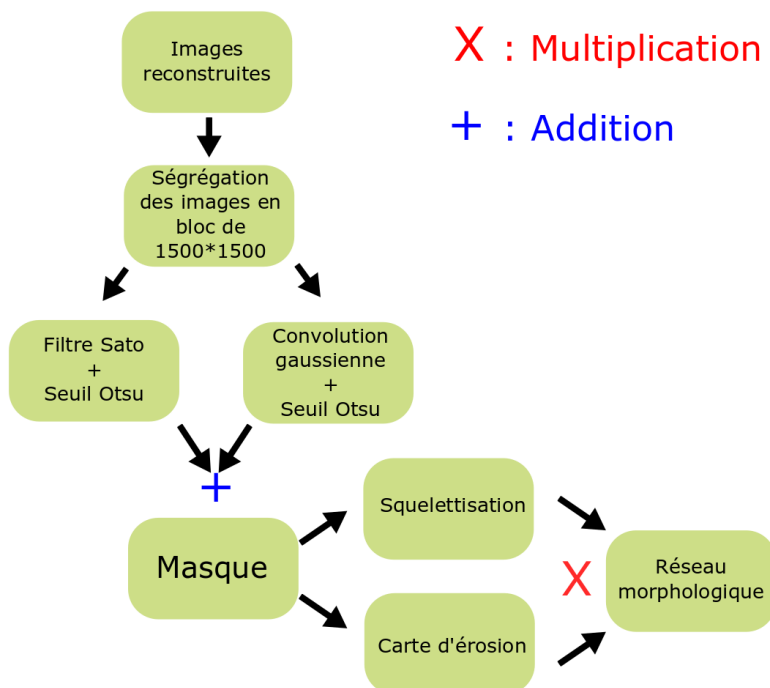


Figure 3.17 : Diagramme de traitement des images. Suite à la reconstruction, le processus de segmentation présenté dans la section 3.4.2 est appliqué sur les images. Partant des images reconstruites jusqu'au résultat du réseau morphologique, les transformations discutées sont représentées sous forme de schéma.

3.4.3 Segmentation des régions d'intérêt

Comme décrit dans la revue de littérature, un outil essentiel pour la segmentation des structures dans le cerveau murin est la troisième version du cerveau atlas provenant de l'institut Allen. Ce fichier moyennant 1675 cerveaux murins avec une résolution de 25 μm et préindexé pour 1038 structures est utilisé comme image déformable par l'outil de coregistration ANTS. En réduisant la résolution des images obtenues par le microscope pour ressembler à celle du cerveau Atlas, il est possible d'utiliser l'outil ANTS et d'effectuer la superposition digitale de l'atlas sur les données acquises. Ce processus donne en résultat le champ de déformation nécessaire afin de transformer l'échantillon de l'espace des données à l'espace de l'atlas. Ce champ de déformation est enregistré sous le même format d'image que les entrées avec une dimension supplémentaire de 3 pour chaque axe de l'espace. Ainsi, l'application de la transformation correspond à des déplacements vectoriels propre à chaque pixel.

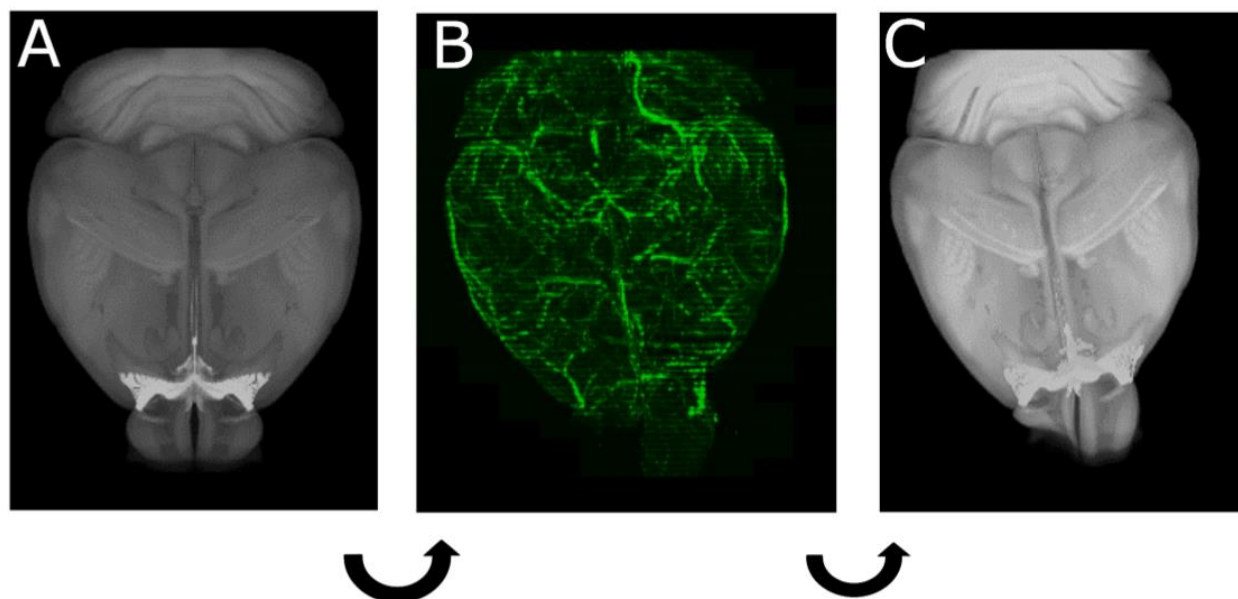


Figure 3.18 : Processus de coregistration. L’atlas de l’institut Allen (A) est superposé sur les données provenant du microscope (B) avec l’aide de la librairie de transformation ANTS utilisant des transformations rigides et non linéaires. Le résultat (C) est l’optimisation de la superposition de l’atlas sur l’échantillon ainsi que le champ de transformation (non montré).

La sauvegarde de ce champ de déformation nous permet de l’appliquer sur toute autre image de même taille. Ainsi, en créant des masques représentant les régions d’intérêt à partir de l’indexation de l’atlas, il est possible d’appliquer ces déformations afin de conserver que les régions d’intérêt. Ensuite, un retour vers la résolution initiale de l’image du microscope est fait afin de faire les comparaisons de groupe. Pour ce projet, quatre masques ont été compilés : les hippocampes, le cortex en excluant le cortex médial préfrontal, le bulbe olfactif et le cortex médial préfrontal. Or, une simple multiplication de ces masques avec les images acquises permet de bien démarquer les zones étudiées. Cependant, il est important de préciser que la superposition doit être effectuée avec l’atlas complet et non seulement les masques. Cette mesure augmente la précision de l’optimisation par le fait que les deux entrées de l’algorithme sont initialement de formes semblables. Par la suite, tous les échantillons ont été masqués et comparés entre cerveaux sains et cerveaux transgéniques selon leur groupe d’âge.

3.4.4 Utilisation du programme SPM

Pour permettre l'analyse statistique des échantillons, l'outil SPM sur la plateforme Matlab a été utilisé afin de trouver des changements locaux de densité de vaisseaux sanguins. Pour y arriver, tous les volumes ont été coregistrés sur le cerveau atlas de l'institut Allen et le processus de segmentation des vaisseaux sanguins a été appliqué. Les cerveaux transformés ont été divisés en section de $200 \times 200 \times 200 \text{ um}^3$, sous-échantillonnés pour cette résolution et filtrés par convolution avec une fonction gaussienne. La valeur résultante attribuée dans le voxel est la densité de vaisseaux sanguins contenus au sein de celui-ci. Le résultat de ces transformations permet d'obtenir une carte de densité sanguine basée sur l'histologie. Ainsi, il est possible de comparer ces résultats avec différentes méthodes d'imagerie de résolution plus faible. Ainsi, les trois groupes d'âge (2, 4.5 et 8 mois) ont été comparés avec leur homologue transgénique.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: WHOLE BRAIN VASCULAR IMAGING IN A MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE WITH TWO-PHOTON MICROSCOPY

Authors: P. DELAFONTAINE-MARTEL^a, J. LEFEBVRE^a, P.-L. TARDIF^a, B.I. LÉVY^c, P. POULIOT^{a,b}, F. LESAGE^{a,b}

^a Dept. of Electrical Engineering, Ecole Polytechnique Montreal, 2900 Boul. Edouard Montpetit, Quebec, H3T 1J4, Canada

^b Research Centre, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

^c Vessels and Blood Institute, Inserm U970 & Hôpital Lariboisière, 75010 Paris, France

In revision at the Journal of Biomedical Optics

Abstract: Given known correlations between vascular health and cognitive impairment, the development of tools to image microvasculature in the whole brain could help investigate these correlations. In this study, we explore the feasibility of using an automated serial two-photon microscope to image fluorescent gelatin-filled whole rodent brains in 3D with the goal of carrying group studies. Vascular density (VD) was computed using automatic segmentation combined with coregistration techniques to build a group-level vascular metric in the whole brain. Focusing on the medial prefrontal cortex, cerebral cortex, the olfactory bulb and the hippocampal formation, we compared the VD of 3 age groups (2, 4.5 and 8 months old), for both wild type mice and a transgenic model (APP/PS1) with pathology resembling Alzheimer's. We report a general loss of VD caused by the aging process with a small VD increase in the diseased animals in the somatomotor and somatosensory cortical regions and the olfactory bulb, partly supported by MRI perfusion data. This study supports previous observations that AD transgenic mice show a higher VD in specific regions compared to WT mice during the early and late stages of the disease (4.5 – 8 months), extending results to whole brain mapping.

Keywords: Massive histology, Two-photon fluorescence imaging, Alzheimer disease

4.1 Introduction

Cognitive impairment was long believed to be primarily due to decreased synaptic density and neuron loss. Recent findings have challenged this idea, suggesting disturbances in white matter (WM) to be a key factor as well [1]. Considerable evidence is accumulating supporting an association between WM lesions and specific cognitive dysfunctions and/or dementia severity [2]–[13]. An association has also been established between vascular disorders, such as hypertension, elevated cholesterol, atherosclerosis and cognitive impairments [14]–[16], and also between cardiovascular risk factors, and WM lesions [13], [17]–[23]. However, exploring the pathogenesis of vascular changes and cognitive impairment beyond the above associations remains difficult and subject to interpretation. It is not yet clear if there are causal effects, or if common processes are involved in the pathophysiology [24]–[26].

A correlation between vascular health and Alzheimer's disease (AD) risk has also been established, with a higher probability of developing AD following exposure to vascular factors such as hypertension, or vascular dementia caused by strokes [14], [27], [28]. Understanding how brain vasculature is modified with AD as a function of age could help underpin these associations. In recent work, Cifuentes et al. [29] used a dual-pathology model to investigate the cross-talk between hypertension and AD in the APP/PS1 mouse and showed that hypertensive APP/PS1 mice have a deficit in episodic-like memory tasks which was associated with increased amyloid deposits and decreased microvascular density in the cortex, the medial prefrontal cortex and the hippocampus. Without hypertension, such differences between APP/PS1 and wild type (WT) controls were subtler, decreased and sometimes reversed (e.g. in the cortex). Given their correlation with amyloid deposits, characterizing these subtle changes in microvasculature at different ages in the whole brain could help characterize the spatio-temporal evolution of the AD pathology. However, such an investigation requires capturing all capillaries in the brain and the development of means to compare them at different time points at the same spatial location. Our goal in this work is to develop a methodology to enable such studies.

Ex vivo imaging remains the gold standard for pathological evaluations of the brain but has historically been hampered by achievable spatial sampling limited by the tissue-slicing and slide-

mounting process. Furthermore, deformations introduced by cutting make spatial comparisons difficult. Recent developments combining depth-resolved imaging with block-face imaging have improved this situation and enabled the 3D reconstruction of whole organs. Ragan et al. [30] demonstrated that coupling a 2-photon microscope with a vibratome and a mechanical stage enabled full 3D fluorescent imaging of the mouse brain. Optical Coherence Tomography (OCT) was also demonstrated to yield contrasted images of WM [31]–[34] that could be correlated to diffusion MRI.

In this work, two-photon microscopy (TPM) was combined with a vibratome to perform whole brain vascular imaging at high resolution. APP/PS1 and WT mice of 2, 4.5 and 8 months were perfused at time of sacrifice with a FITC-gelatin perfusate to fill brain vasculature, and imaged serially. Combining images into a mosaic, 3D brain reconstructions were built and co-registered with each other using tools adapted from Magnetic Resonance (MR) image processing. A brain atlas mask was then used to identify specific regions of interest (ROI) [29]. Quantification of microvascular density in ROIs, i.e. the hippocampus, the cortex, the olfactory bulb and the medial prefrontal cortex, was performed and compared to controls as a function of age. We then extended our results by building a local estimate of VD from raw images and performing whole brain comparison using statistical parametric mapping (SPM) techniques.

4.2 Materials and methods

The Animal Research Ethics Committee of the Montreal Heart Institute approved all procedures, in accordance with the Canadian Council on Animal Care recommendations.

4.2.1 Mice groups

For vascular imaging, heterozygous APP/PS1 and their control littermates (C57BL/6J, here referred to as wild type (WT)) mice were divided into 3 age groups (2, 4.5 and 8 months old). Each group consisted of N=5 animals for a total of N=30. APP/PS1 mice start developing AD around 4.5 months with full pathology presenting at 8 months. Two other groups of 21 WT and 25 AD mice at 6 months were also used to gather perfusion MRI estimates in the same species.

4.2.2 Brain perfusion and fixation

Animals were briefly anesthetized with 2% isoflurane and received intra-cardiac perfusion through the apex of the heart with 30 mL phosphate buffered saline (PBS, 0.3ml/min) followed by 30 mL of 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS also at a rate of 0.3 mL/min and then perfused with a FITC-gelatin perfusate (20 ml at 0.6ml/min, 2% porcine skin gelatin type A (G1890, Sigma), 1% fluorescein-labeled-albumin (A9771, Sigma) with the body tilted to 30° head down in supine position. At the last step, the mouse head was submerged in ice water with the heart clamped to ensure gel solidification. After 15 minutes of cooling, the brain was carefully retrieved and kept in PFA for later imaging.

4.2.3 Imaging sytem

The imaging system used a femtosecond dual beam laser (Insight DS+, Spectra Physics) with tunable range from 680 nm to 1300 nm. A motorized XY-stage (Zaber T-Series LSR150B) allowed moving the sample for mosaic acquisitions, to cover the entire sample. The objective used was XLFluor 4x/340, NA 0.28, WD 29.5mm (Olympus, Japan). Sample Z-positioning was controlled by a motorized labjack (MLJ050, Thorlabs). The scanning system consisted of galvo mirrors (GVS002, Thorlabs) coupled by two converging lenses to place both mirrors at the scanning distance of the scan objective to reduce beam ‘walking’ on the imaging-objective back aperture. A 4x beam expander was installed behind the galvo mirrors to fill the imaging-objective aperture with the telescope. A variable attenuator consisting of a polarizing cube and half-wave plate controlled the incoming power to the microscope. To ensure a constant signal throughout the tissue, laser power was controlled during the acquisition to correct for attenuation. A custom-made vibratome was installed to cut sample blocks. Fluorescence signal detection was done following a dichroic long pass (Chroma, 695dcxxr) and a bandpass filter (ET525/50M-2P, Chroma Technology) placed in front of the photomultiplier tube (Hamamatsu PMT). After the acquisition of a complete slice, a section of 200µm was removed to expose a new surface to the microscope. Figure 4.1 provides an overview of the apparatus.

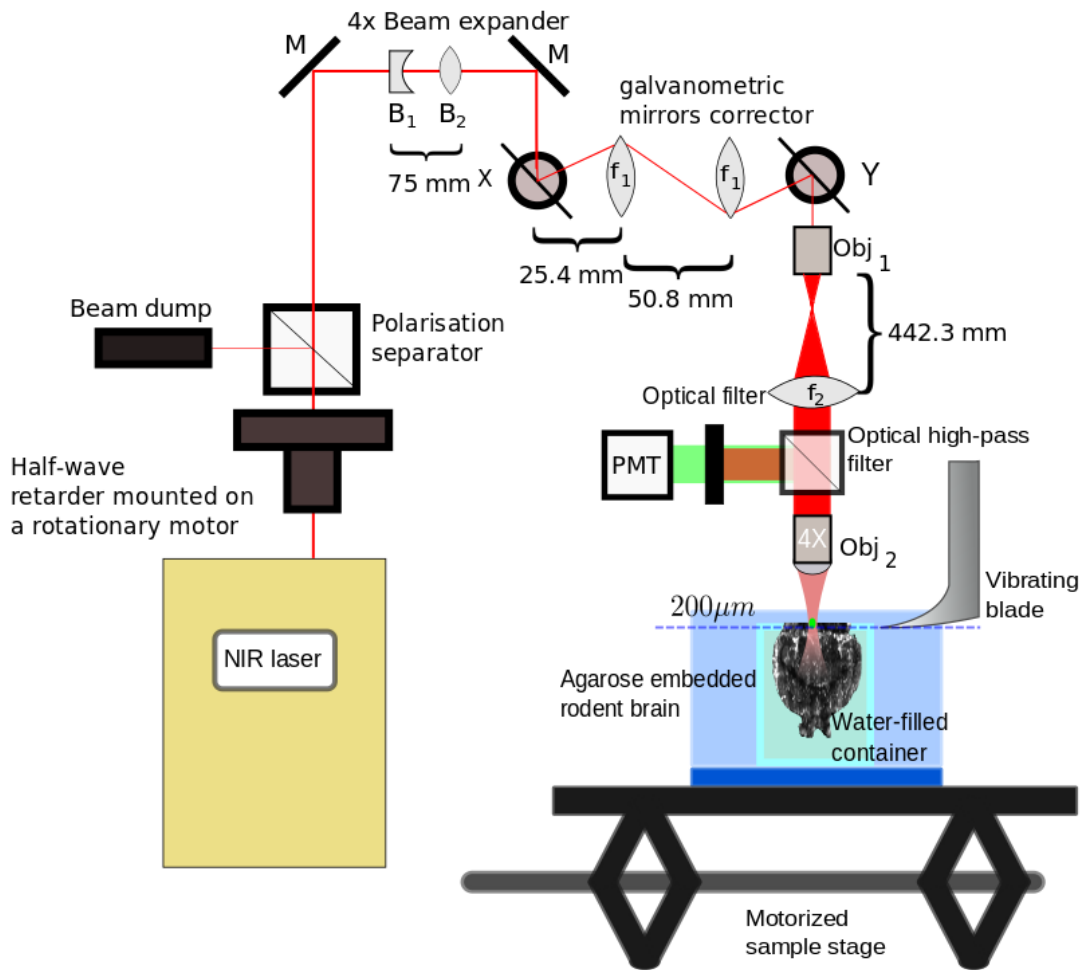


Figure 4.1 : Overview of the serial two-photon microscope. Legend: B_1 : 25mm, LC1054; B_2 : 100.0mm, LA1207-B; f_1 : 25.4mm AC254-030-B Lens (Thorlabs); f_2 : 400mm focal AC508-400-B-ML Lens (Thorlabs); Obj_1 : LSM04-BB, working distance 42.3mm; Obj_2 : XL Fluor 4X objective; M: mirrors.

Imaging of the sample was implemented by combining images from different physical positions set by the XY stages. The raw images were taken with a 20% overlap in the XY plane and a 25% overlap in the depth Z-axis to ensure continuity in the stitching reconstruction. The microscope then proceeded automatically through the tiles, followed by vibratome sectioning, repeating the procedure until the whole brain was imaged. An algorithm was implemented to detect the cut sample surface using the maximal fluorescence signal received from a complete A-scan (moving the objective along Z). Measuring the surface at multiple locations, a plane was fit to the data and was used for image stack acquisition. Since the vibratome did not cut a perfectly straight plane

parallel to the imaging focal plane, this scan allowed modeling the imaging plane tilt along the entire sample to ensure that all the sample was imaged uniformly.

4.2.4 Characterisation of the imaging system

To measure the axial resolution of the microscope, 4 μ m diameter fluorescent beads (F36909 FocalCheckTM fluorescence microscope test slide #1, ThermoFisher) were scanned. An imaging sequence with z-steps of 10 μ m was performed and analyzed. To compute the lateral resolution of the system, a target (R1L1S1N, Negative 1951 USAF Target, ThorLabs) was used. The Edge Spread Function (ESF) from an edge of the target lines was used for lateral resolution estimation with a digital step of 0.1 x 0.1 μ m² to ensure an image limited by optical resolution.

4.2.5 Image reconstruction

Reconstruction consisted in transformations on raw tile data, to form a full 3D image. The raw data were labeled on a 3-dimensional grid to perform a tile registration optimization using a phase-correlation pairwise registration method inspired by Preibisch and al. [35] and developed by Lefebvre and al. [31]. Stitching of the XY planes was done using a Laplacian diffusion method with a blending width of 0.2 in units of overlap size fraction [31]. After reconstruction, a maximum intensity profile was applied on 250 μ m thick slabs. In some instances, we discarded unclear slices caused by issues described later in this report.

4.2.6 Coregistration method and vascular template construction

As a first step, the imaged brains were digitally downsized to 25x25x25 μ m³ resolution. Advanced Normalization Tools (ANTs) were used for coregistration to a template from the Allen Brain Institute using rigid followed by non-linear registration [36], [37]. As a second step, since a custom template typically outperforms using a generic template [40], these coregistered data were used as input to an algorithm inspired from [38], [39] to create a vascular template from our own data. By including the mirror images of the 30 brains, a grand total of 60 brains were coregistered to form a

vascular template which was also coregistered to the Allen template. The ROIs defined from the Allen Brain Institute mouse template were then deformed onto each brain through the transformations defined by the deformation fields, and used for evaluations below.

4.2.7 Vessels extraction and volume computation

Large vessels (15 μ m in diameter or larger) were segmented using a variable thresholding based on local image properties by a local Otsu threshold on image patches 1501 pixels or 3002 μ m large, followed by a small median filter (2x2 pixels or 4x4 μ m) to reduce segmentation noise. For smaller vessels, a Sato filter using a diameter of 2 μ m was applied [41]. Since the latter method can only distinguish eigenvalues in the data, it can underline the contour of larger vessels causing a “webbing” artifact (see Figure 4.5). Combining both filters resulted in a multi-scaled image with contrast for both small and large vessels in the imaged organ. After the segmentation process, a manual verification was performed to correct major deformations that could have been due to artifacts such as leakage of the vascular system causing diffusion zones in the sample. After this last step, and keeping only microvasculature (15 μ m in diameter or less), a distance transform was applied on the mask followed by skeletonization. To compute vascular density, a model of cylindrical vessels using the pixel value as radii and the resolution as length was computed based on the distance map evaluated on the skeleton.

4.2.8 Local density template comparison

To investigate whether VD changes had a spatial structure we estimated local VD in small-windowed regions of 200 μ m and built reduced-resolution VD images (200x200x200 μ m³). These images were then mapped to the vascular template to ensure a correspondence between each voxel. Voxel-wise analysis was performed with 2-way ANOVA with age and the genetic strain as factors, using the SPM12 toolbox [46]. The ANOVA results showed no interaction and a statistically weak main effect of the genetic strain over the whole cortex, consistent with the analysis of Cifuentes et al. [29]. Therefore, the ROIs in Cifuentes et al., namely the hippocampal formation, the medial prefrontal cortex (mpfc), and cerebral cortex without the mpfc, were chosen to pursue the analysis, to which we added also the olfactory bulb based on the voxel-wise ANOVA.

4.2.9 MRI Data for comparison

To assess whether VD changes had MRI correlates, we compared our vascular density TPM results with perfusion acquisitions. 21 WT and 25 AD mice all aged 6 months (mid time point compared to the 4.5 and 8 months groups used for TPM) were imaged in an MRI scanner. Anatomical and perfusion MRI scans were performed on a 30 cm 7T horizontal MR scanner (Agilent, Palo Alto, CA) with mice in prone position, with a 12 cm inner diameter gradient coil insert, gradient strength 600 mT/m, rise time 130 μ s. A 2-channel receive only surface coil positioned over the mouse brain was used in combination with a quadrature transmit/receive birdcage coil with an internal diameter of 69 mm (RAPID Biomedical, Germany). Anesthesia was maintained with 1.5-2.5% isoflurane in 30% oxygen in air and body temperature was maintained at 37.0°C using a warm air fan (SA Instruments, Stony Brook, NY). Respiration (target=100, allowed range before adjusting isoflurane=80-120 BPM) and heart rate were monitored, the latter with a pulse oximeter.

An anatomical image was acquired with a 3D true free induction with steady-state precession (TFISP) sequence [42] at 100 μ m isotropic resolution (TR=5.0 ms/TE=2.5 ms, 16 frequency shifts, 22 mins scan time), used for coregistration. Then a 3D amplitude-modulated continuous arterial spin labeling scan (amCASL) was run [43], with TR = 3.0 s, 1.0 s labeling duration, 60 x 54 x 48 matrix, 300 x 333 x 333 μ m resolution, 23 mins scan time. The tagging plane was kept in a fixed position nominally perpendicular to the carotids.

4.2.10 MRI data analysis

Perfusion was calculated voxel-by-voxel using formula 1 in [43], with some parameters assumed constant: brain/blood partition coefficient=0.9 mL/g, mouse arterial blood transit time=0.08 s, tagging efficacy=0.67, T_{1b} = 2.3 s, T_1 = 1.53 s, T_{1sat} = 0.57 s, $M_a^z(w)$ = 0.48 s. The anatomical scans were first manually coregistered rigidly using ITK-SNAP [44] to a previously generated mouse template, then coregistered non-linearly with ANTs [45]. This provided the ANTs transformations to coregister the perfusion images. Coregistration results were inspected in detail, and registration parameters were stored as potential confounding variables. SPM [46] voxel-by-voxel analyses

were run on the perfusion images. The lack of any statistically strong effect suggested pursuing the analysis using the above 4 ROIs as for the ex vivo scanner study. The MarsBar [47] toolbox in SPM was also used for the ROI statistics and to extract the average perfusion data.

4.3 Results

4.3.1 Optical system characterization

As a first step, the two-photon microscopy system was evaluated using resolution targets described in section 2.4. From fluorescent bead imaging and the ESF computation, the resolution of the optical system was measured to be $2.1\mu\text{m}$ in the lateral direction, and had a FWHM of $25\mu\text{m}$ in z. This experimental resolution ensured that $50\mu\text{m}$ z-motor steps during the acquisition procedure led to independent data from neighboring voxels.

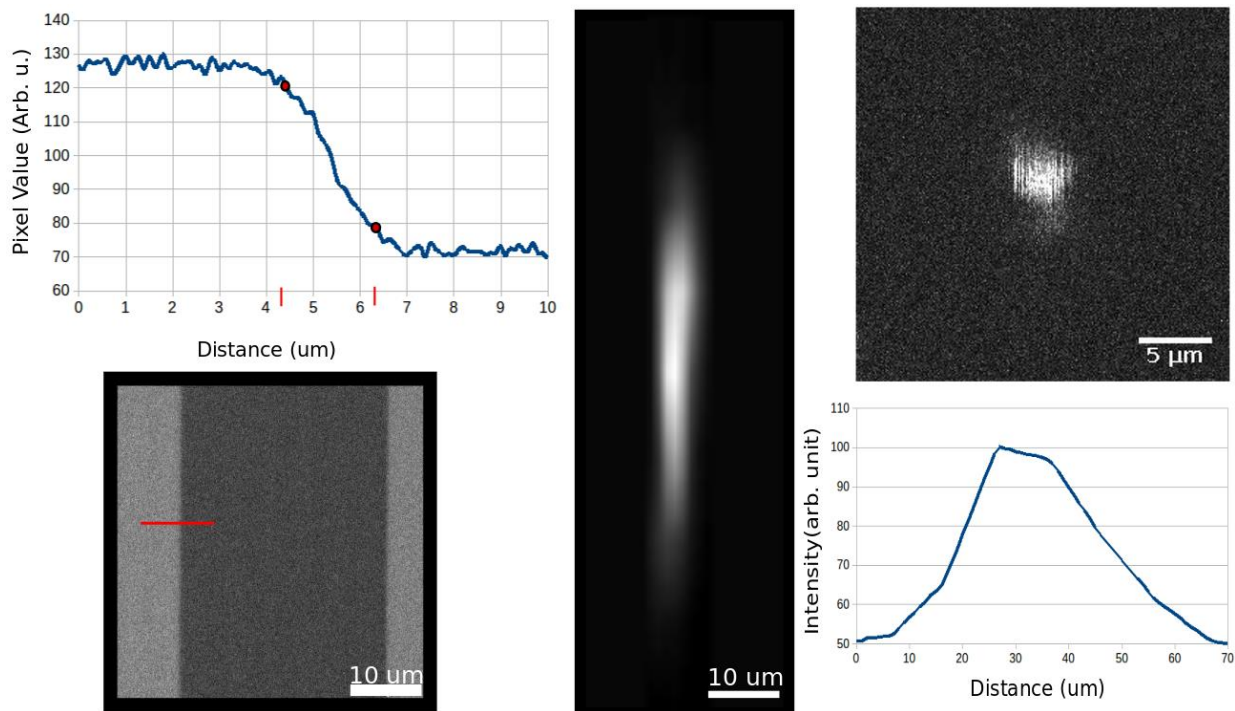


Figure 4.2 : ESF profile (Top left) showing 10% and 90% points on the original image (Bottom left). The distance separating these points is $2.1\mu\text{m}$. Side view of the PSF shows the elongated form given by the 4x objective (Middle). Top view of an imaged bead (Top right). The profile of the bead long axis yields a FWHM of $25\mu\text{m}$.

4.3.2 Raw data coregistration and image segmentation

A vascular template was built from the data for each brain downsampled at an isotropic resolution (25 μ m). In this process, each brain was co-registered to this new template. The template, and hence each brain, were also coregistered to the Allen template. Figure 4.3 shows a typical coregistration for one brain.

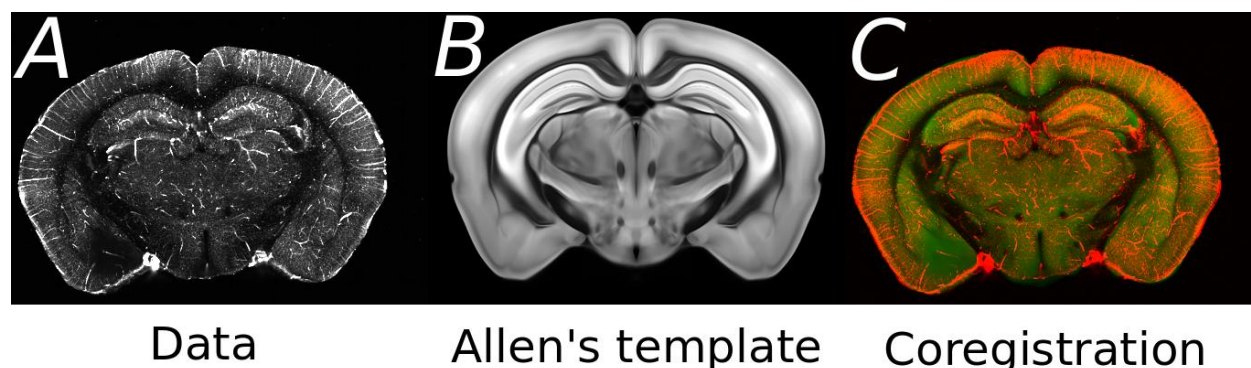


Figure 4.3: A: Representative 250 μ m MIP from one mouse, reconstructed from the two photon microscope data. B: Brain template from the Allen's Brain Institute. C: Overlay image representing the template (B in green) coregistered on the data (A in red) using the ANTs library.

Figure 4.4 shows the created template (B) aligned to the Allen template (A). Note that some sharp bright features are present in the vascular template. They were inspected to correspond to large blood vessels seen on many individual brains. We also observed that some regions of the olfactory bulb template have lower intensity. This corresponded to a few brains for which the bulb was incomplete. This may have been arisen because all brains were cut along coronal sections with the olfactory bulb being the last surface to be exposed. Its mechanical stability in oxidized agarose was sometimes compromised, leading to data loss.

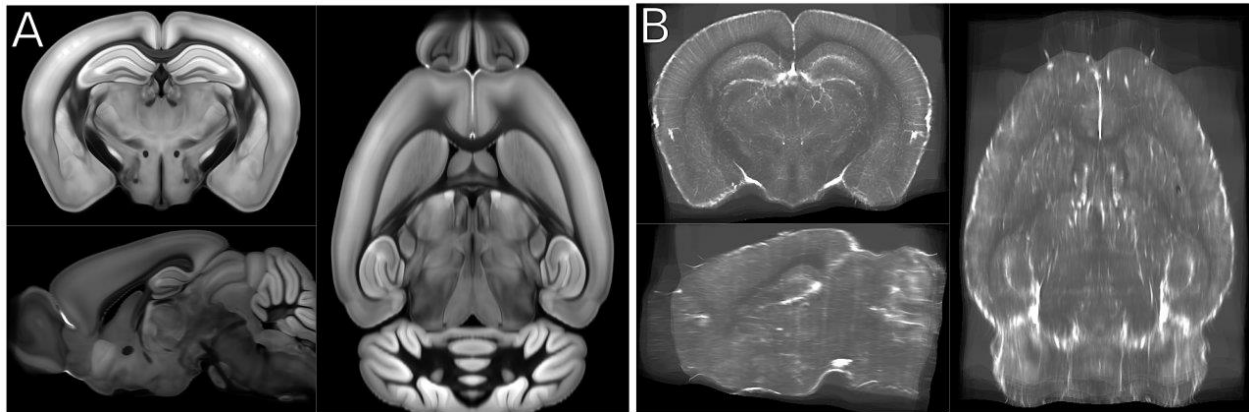


Figure 4.4 : Illustration of the Allen template with 25μm resolution (A) compared to the custom vascular template with the same resolution (B).

The ROIs derived from the Allen template atlas were mapped to the individual brains, using the transformation fields from template construction, and upsampled in the process to the original spatial resolution of the acquisition. These masks were then used for VD estimations derived from the segmentation process shown below.

The segmentation procedure described in section 2.7 was applied on each brain using the full resolution. Figure 5 shows the results of this segmentation at intermediate steps, including the webbing effect in large vessels following Sato filtering and its correction through a mask combination step. The process yielded local estimates of vessel radius which were used to compute VD with or without thresholds for vessel size.

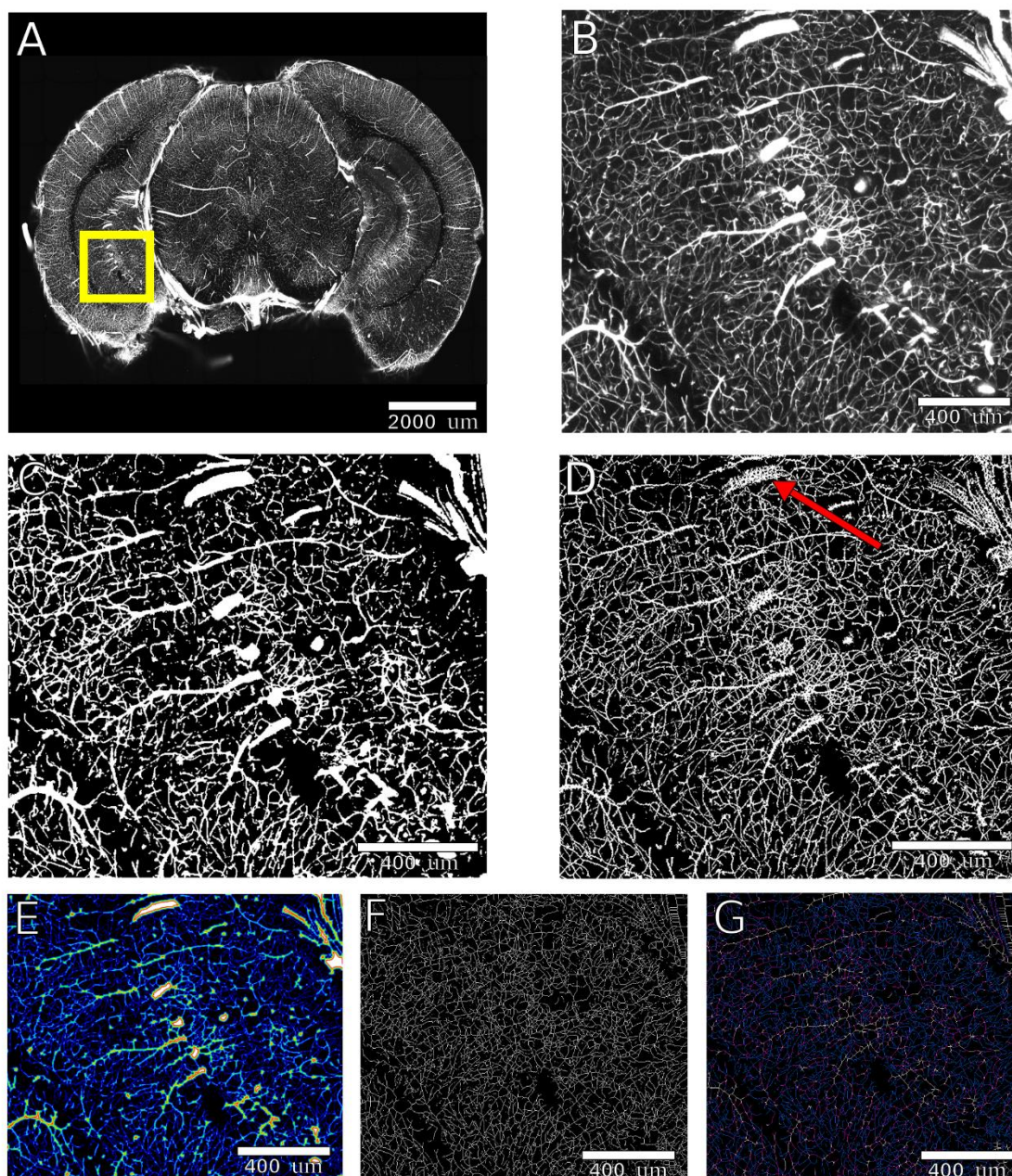


Figure 4.5: Visualization of the segmentation algorithm (A) MIP from one brain. (B) Zoom on the inferior left hippocampal complex. (C) Local Otsu threshold applied on B. (D) Sato filter applied followed by an Otsu threshold. One can see the “webbing” vessels pointed by the red arrow of larger caused by the Sato filter. The local Otsu threshold combined with a median filter captures the larger blood vessels while the Sato filter recovers smaller vessels with little salt-and-pepper noise. (E) A distance transformation is performed on the combination of the two masks and combined with the vessel center points derived from skeletonization by multiplication (F). As a result, we obtain an image in which pixels are the vessels radii (G).

4.3.3 Voxel-wise SPM analysis

At $p < 0.05$ uncorrected for false positives, results of the 2-ANOVA for VD showed a main effect of genetic strain covering the cortical area, the upper hippocampal complex and some of the olfactory bulb. As discussed above, unfortunately, the olfactory bulb was truncated due to missing data for this structure and only the portion having complete overlap across all brains was kept for analysis. Based on this result, we selected the ROIs shown in Figure 4.7 below.

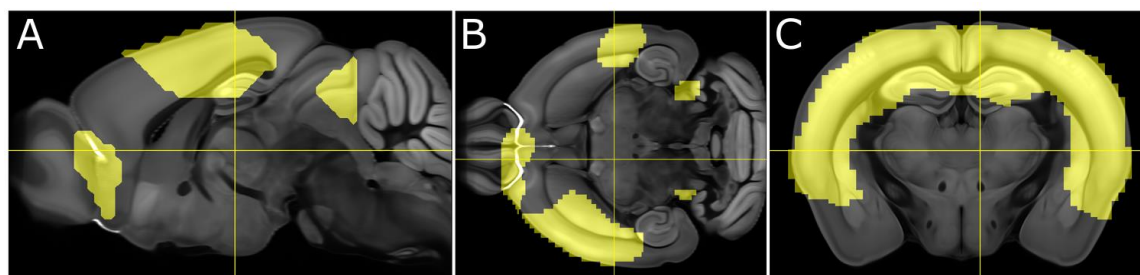


Figure 4.6 : A: Sagittal view of the Allen template with Student's T-test positive for the contrast APP/PS1 > WT at $p < 0.05$, uncorrected. B: Axial view. C: Coronal view.

4.3.4 ROI analysis

Guided by previous observations using sparse sampling histology and the voxel-wise analysis above, we evaluated VD in 4 pre-defined ROIs: the hippocampal complex, the medial prefrontal cortex, the (truncated) olfactory bulb and the cortex without the mpfc (Figure 4.7).

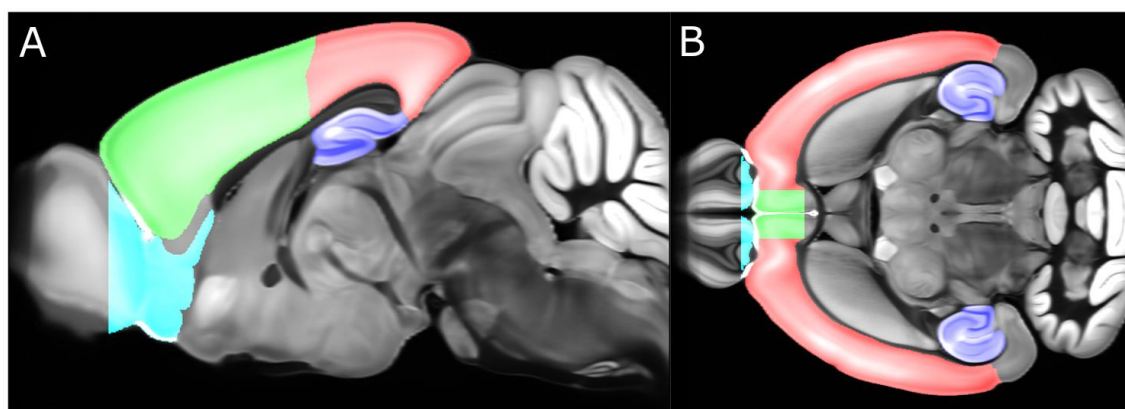


Figure 4.7: A: Sagittal view of the Allen template with the different ROIs (Hippocampal complex in blue, Cortex in red, truncated olfactory bulb in cyan and Medial Prefrontal Cortex in green). B: Axial view of A.

Following the ROI mapping process and restricting to the microvasculature (<15um) only, VD was computed and is shown in Figure 4.8 for each ROI.

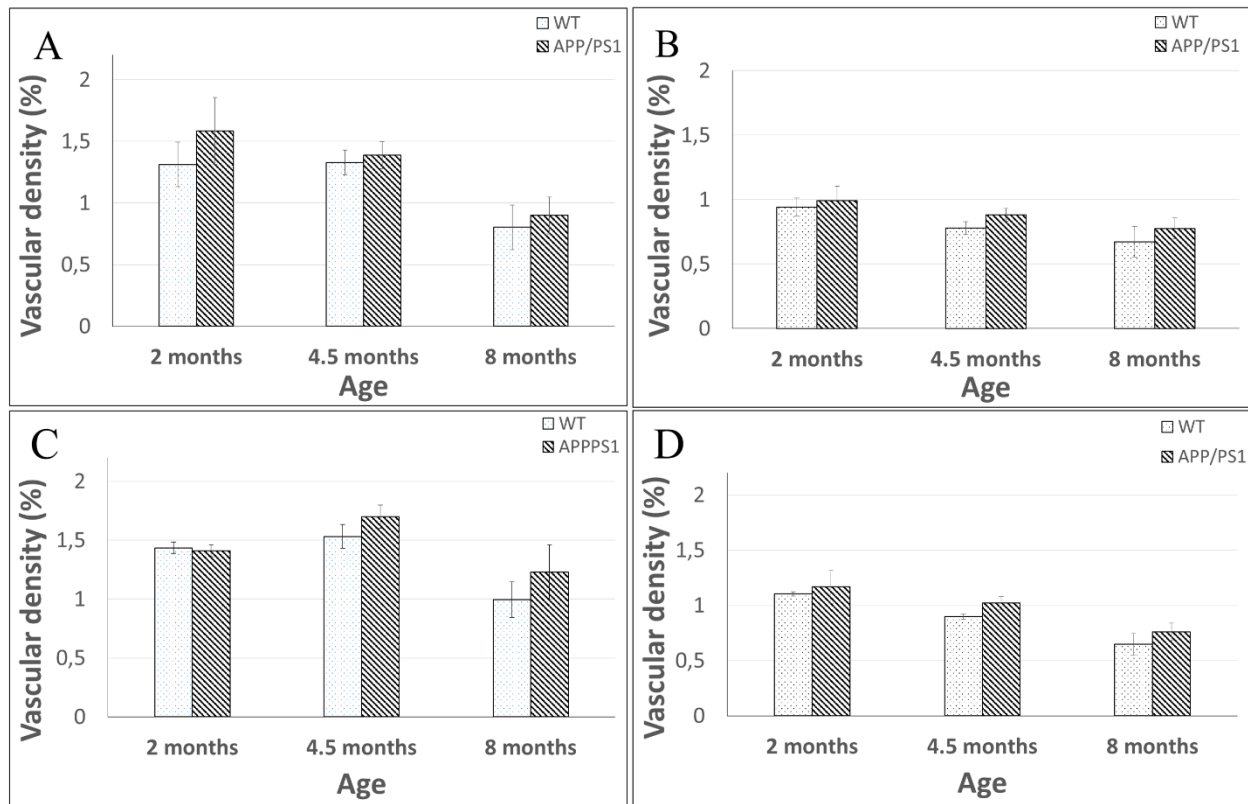


Figure 4.7: Vascular density for each group and ROI. A. Hippocampal ROI. B. Medial prefrontal cortex ROI. C. Cortex without the mpfc. D. Truncated olfactory bulb. One-tailed student T-tests were performed with $*p < 0.05$ considered significant after Tukey-Kramer correction for the contrasts and Bonferroni correction for the 4 ROIs. Error bars represent one standard error on mean.

2-way ANOVAs with age and genetic strain as factors showed a statistical significance for the mpfc and the olfactory bulb for the age factor, after Bonferroni correction for 4 regions, and removing 2 mice which were outliers. Post hoc tests showed that the VD decrease in 8-months-old mice compared to 2 months was significant for the above two ROIs. There, we also observed a tendency for VD decrease for all regions between 2 and 4.5 and between 4.5 and 8 months old for both APP/PS1 and WT mice. Furthermore, there was a tendency for higher VD in the APP/PS1

group when compared to the WT. The MRI perfusion data analyzed for comparison showed no statistical significance for the 4 ROIs except for a nearly significant effect in the olfactory bulb ($p=0.017$, APP/PS1>WT), correlating with VD increase in the same region but that disappeared following Bonferroni.

4.4 Discussion

In this work, we developed a methodology that combined serial histology and 3D reconstruction of microvasculature with whole-brain templates to investigate subtle changes in vasculature over most of the brain. Our work showed that it is possible to combine multiple serial acquisitions of microvasculature into a template which can then be used to map vascular density changes across the brain.

A major challenge with our approach is consistent data acquisition. In some samples, the vibratome tissue cut was not optimal due to a misalignment of the blade. This led to defects in the form of zones where the imaging surface was uneven. This led to reduced resolution and sensitivity due to higher attenuation over the relatively thicker zones, impacting the VD estimates and leading to increased variance. In our data, these defects were mostly seen in the first samples from the 8-month-olds groups, until the blade problem was fixed. Due to this, two of the 8-month-old brains could not be analyzed due to larger artifacts. Luckily, these brains were in different groups, distributing the loss equally for the 8 months old brains.

The local vascular analysis showed a tendency for a VD increase in all ROIs as early as the start of the deposition of the A β plaques at 4.5 months. It should be noted that the data shown in Figure 4.8 did not contain the complete olfactory bulb since sample extraction or the vibratome sequence caused some tissues to miss parts of the olfactory bulb. Also, ROI averaging canceled the APP/PS1>WT effect seen in the voxel-wise analysis. However, the clusters located at the frontal part of the brain contain most of the olfactory connections such as the Tenia tecta, the anterior commissure of the olfactory limb and the anterior olfactory nucleus. It has been previously observed that a mouse model of Alzheimer's disease develops an impaired olfactory perceptual acuity which could be explained by A β proteins deposition [48] or, in this case, the angiogenesis process following undetermined mechanisms. Supporting this observation, we reported an

increased perfusion, but still not significantly higher, in the olfactory limb of 6 months old APP/PS1 mice compared to WT mice, thereby consistent with VD increase there during the development of the disease. Moreover, Figures 8 are indicative of a gradual VD decrease with the aging process. But no differences were evident between the AD group and the WT group. The 2-way ANOVAs performed on the ROIs pointed out that the age was nearly statistically significant, giving us insight that the aging process tends to diminish vascular density in mice.

Voxel-wise analysis of the local VD maps suggests angiogenesis in cortical areas such as the somatomotor and somatosensory cortex of APP mice which is also paired with an increased burden of A β deposition for older mice. Motor decline known as apraxia is a symptom for AD patients and transgenic mice [49]. This observation is supported by the cerebral cortex VD in Figure 8C. Moreover, the higher vascular density tendencies distinguished in the cortical areas and the hippocampal complex are not supported by the perfusion MRI data. Comparing our work with the results of Cifuentes et al. [29], we observe the same tendencies of higher VD except in the mpfc where Cifuentes et al. do not. Looking into their results shows a statistically significant change for the VD in the cortex which could be a false positive due to smaller samples of images. The technique presented in this study contains a higher number of samples due to smaller slices imaged and a higher number of samples procuring numerous images thus giving a more powerful statistical analysis. Moreover, we included the olfactory bulb as a ROI which was not considered in their previous study.

Even with the automatization implemented here, a disadvantage of the technique resides in the time required to prepare all the samples (n=30). By upgrading the imaging system optical components, we could reduce the acquisition time significantly by a time factor of 4. Such an upgrade will enable recording a higher number of samples and facilitate the study of subtle changes requiring higher statistical power.

4.5 Conclusion

In conclusion, we combined a two-photon microscope and a custom vibratome to perform block-face imaging of fluorescent gelatin-filled vessels. The imaging resolution was characterized to ensure that the system could measure blood vessel density. Following post-processing

segmentation to compute VD in APP/PS1 and wild-type brain samples, we investigated predefined ROIs (cerebral cortex, hippocampal formation, olfactory bulb and medial prefrontal cortex) identified in previous studies to have vascular changes. Results point to a trend for an overall reduction of VD, which correlates with the mouse aging process.

For further investigations, we will include multimodal imaging such as Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS) to obtain a contrast sensitive to white matter density and to correlate this contrast to a local vascular density map obtained by conjoined two-photon microscopy data, to gain more insight on the mechanisms underlying Alzheimer's disease.

Disclosures

The authors declare no competing financial interests.

Aknowledgements

This work was supported by CIHR and NSERC Discovery Grant program to F. Lesage, and by NSERC Discovery Grant, RGPIN-2014-06089 to P. Pouliot. A special thanks to Samuel Bélanger, Alexandre Castonguay and Maxime Abran for technical support. An earlier version is available as proceeding from the SPIE 2018 – BIOS conference [50].

4.6 References

- [1] S. G. Kohama, D. L. Rosene, and L. S. Sherman, "Age-related changes in human and non-human primate white matter: from myelination disturbances to cognitive decline," *Age Dordr. Neth.*, vol. 34, no. 5, pp. 1093–1110, Oct. 2012.
- [2] M. Targosz-Gajniak, J. Siuda, S. Ochudło, and G. Opala, "Cerebral white matter lesions in patients with dementia – from MCI to severe Alzheimer's disease," *J. Neurol. Sci.*, vol. 283, no. 1–2, pp. 79–82, Aug. 2009.
- [3] Prins ND, van Dijk EJ, den Heijer T, and et al, "Cerebral white matter lesions and the risk of dementia," *Arch. Neurol.*, vol. 61, no. 10, pp. 1531–1534, Oct. 2004.

- [4] F. Fazekas, P. Kapeller, R. Schmidt, H. Offenbacher, F. Payer, and G. Fazekas, "The relation of cerebral magnetic resonance signal hyperintensities to Alzheimer's disease," *J. Neurol. Sci.*, vol. 142, no. 1–2, pp. 121–125, Oct. 1996.
- [5] R. Barber *et al.*, "White matter lesions on magnetic resonance imaging in dementia with Lewy bodies, Alzheimer's disease, vascular dementia, and normal aging," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 67, no. 1, pp. 66–72, Jul. 1999.
- [6] M. Yoshita *et al.*, "Extent and distribution of white matter hyperintensities in normal aging, MCI, and AD," *Neurology*, vol. 67, no. 12, pp. 2192–2198, Dec. 2006.
- [7] J. C. de Groot, M. Oudkerk, J. v Gijn, A. Hofman, J. Jolles, and M. M. Breteler, "Cerebral white matter lesions and cognitive function: the Rotterdam Scan Study," *Ann. Neurol.*, vol. 47, no. 2, pp. 145–151, 2000.
- [8] J. M. Ferro and S. Madureira, "Age-related white matter changes and cognitive impairment," *Vasc. Dement. Pap. 2nd Congr. Vasc. Dement.*, vol. 203–204, no. 0, pp. 221–225, Nov. 2002.
- [9] D. W. Desmond, "Cognition and White Matter Lesions," *Cerebrovasc. Dis.*, vol. 13(suppl 2), no. Suppl. 2, pp. 53–57, 2002.
- [10] M. M. Breteler *et al.*, "Cognitive correlates of ventricular enlargement and cerebral white matter lesions on magnetic resonance imaging. The Rotterdam Study.," *Stroke*, vol. 25, no. 6, pp. 1109–1115, Jun. 1994.
- [11] B. C. Bowen, W. W. Barker, D. A. Loewenstein, J. Sheldon, and R. Duara, "MR signal abnormalities in memory disorder and dementia.," *Am. J. Neuroradiol.*, vol. 11, no. 2, pp. 283–290, Mar. 1990.
- [12] Kertesz A, Polk M, and Carr T, "Cognition and white matter changes on magnetic resonance imaging in dementia," *Arch. Neurol.*, vol. 47, no. 4, pp. 387–391, Apr. 1990.
- [13] F. Fazekas, J. B. Chawluk, A. Alavi, H. I. Hurtig, and R. A. Zimmerman, "MR Signal Abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's Dementia and Normal Aging," *Am. J. Neuroradiol.*, vol. 8, no. 3, pp. 421–426, May 1987.
- [14] I. Skoog *et al.*, "15-year longitudinal study of blood pressure and dementia," *The Lancet*, vol. 347, no. 9009, pp. 1141–1145, 1996.
- [15] D. L. Sparks, S. W. Scheff, H. Liu, T. M. Landers, C. M. Coyne, and J. C. Hunsaker III, "Increased incidence of neurofibrillary tangles (NFT) in non-demented individuals with hypertension," *J. Neurol. Sci.*, vol. 131, no. 2, pp. 162–169, 1995.
- [16] A. Hofman *et al.*, "Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study," *The Lancet*, vol. 349, no. 9046, pp. 151–154, 1997.
- [17] F.-E. de Leeuw *et al.*, "Aortic Atherosclerosis at Middle Age Predicts Cerebral White Matter Lesions in the Elderly," *Stroke*, vol. 31, no. 2, pp. 425–429, Feb. 2000.

- [18] M. Bots *et al.*, “Cerebral white matter lesions and atherosclerosis in the Rotterdam Study,” *The Lancet*, vol. 341, no. 8855, pp. 1232–1237, 1993.
- [19] A. E. George *et al.*, “Leukoencephalopathy in normal and pathologic aging: 1. CT of brain lucencies,” *Am. J. Neuroradiol.*, vol. 7, no. 4, pp. 561–566, 1986.
- [20] J. Van Swieten, L. Kappelle, A. Algra, J. Van Latum, P. Koudstaal, and J. Van Gijn, “Hypodensity of the cerebral white matter in patients with transient ischemic attack or minor stroke: influence on the rate of subsequent stroke,” *Ann. Neurol.*, vol. 32, no. 2, pp. 177–183, 1992.
- [21] W. D. Taylor *et al.*, “Serial MR imaging of volumes of hyperintense white matter lesions in elderly patients: correlation with vascular risk factors,” *Am. J. Roentgenol.*, vol. 181, no. 2, pp. 571–576, 2003.
- [22] G. Waldemar *et al.*, “White matter magnetic resonance hyperintensities in dementia of the Alzheimer type: morphological and regional cerebral blood flow correlates,” *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 57, no. 12, pp. 1458–1465, 1994.
- [23] K. Rowe Bijanki *et al.*, “Characterizing white matter health and organization in atherosclerotic vascular disease: A diffusion tensor imaging study,” *Psychiatry Res. Neuroimaging*, vol. 214, no. 3, pp. 389–394, Dec. 2013.
- [24] C. Lecrux and E. Hamel, “The neurovascular unit in brain function and disease,” *Acta Physiol.*, vol. 203, no. 1, pp. 47–59, Sep. 2011.
- [25] I. Segura, F. De Smet, P. J. Hohensinner, C. R. de Almodovar, and P. Carmeliet, “The neurovascular link in health and disease: an update,” *Trends Mol. Med.*, vol. 15, no. 10, pp. 439–451, 2009.
- [26] J. C. de la Torre, “Cerebrovascular and cardiovascular pathology in Alzheimer’s disease,” *Int. Rev. Neurobiol.*, vol. 84, pp. 35–48, 2009.
- [27] M. Kivipelto *et al.*, “Midlife vascular risk factors and Alzheimer’s disease in later life: longitudinal, population based study,” *BMJ*, vol. 322, no. 7300, pp. 1447–1451, Jun. 2001.
- [28] H. Girouard, “Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 100, no. 1, pp. 328–335, Jan. 2006.
- [29] D. Cifuentes *et al.*, “Hypertension accelerates the progression of Alzheimer-like pathology in a mouse model of the disease,” *Hypertension*, vol. 65, no. 1, pp. 218–224, Jan. 2015.
- [30] T. Ragan *et al.*, “Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brain imaging,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 3, pp. 255–258, Jan. 2012.
- [31] J. Lefebvre, A. Castonguay, P. Pouliot, M. Descoteaux, and F. Lesage, “Whole mouse brain imaging using optical coherence tomography: reconstruction, normalization, segmentation, and comparison with diffusion MRI,” *Neurophotonics*, vol. 4, no. 4, pp. 041501–041501, 2017.

- [32] A. Castonguay, J. Lefebvre, P. Pouliot, P. Avti, M. Moeini, and F. Lesage, “Serial optical coherence scanning reveals an association between cardiac function and the heart architecture in the aging rodent heart,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 8, no. 11, pp. 5027–5038, Nov. 2017.
- [33] H. Wang, J. Zhu, and T. Akkin, “Serial optical coherence scanner for large-scale brain imaging at microscopic resolution,” *NeuroImage*, vol. 84, pp. 1007–1017, Jan. 2014.
- [34] H. Wang *et al.*, “Reconstructing micrometer-scale fiber pathways in the brain: Multi-contrast optical coherence tomography based tractography,” *NeuroImage*, vol. 58, no. 4, pp. 984–992, Oct. 2011.
- [35] S. Preibisch, S. Saalfeld, and P. Tomancak, “Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions,” *Bioinformatics*, vol. 25, no. 11, pp. 1463–1465, Apr. 2009.
- [36] A. Klein *et al.*, “Evaluation of volume-based and surface-based brain image registration methods,” *NeuroImage*, vol. 51, no. 1, pp. 214–220, May 2010.
- [37] G. A. Johnson *et al.*, “High-throughput morphologic phenotyping of the mouse brain with magnetic resonance histology,” *NeuroImage*, vol. 37, no. 1, pp. 82–89, Aug. 2007.
- [38] L. Kuan *et al.*, “Neuroinformatics of the Allen Mouse Brain Connectivity Atlas,” *Methods San Diego Calif*, vol. 73, pp. 4–17, Feb. 2015.
- [39] A. L. Janke and J. F. P. Ullmann, “Robust methods to create ex vivo minimum deformation atlases for brain mapping,” *Methods San Diego Calif*, vol. 73, pp. 18–26, Feb. 2015.
- [40] B. B. Avants *et al.*, “The optimal template effect in hippocampus studies of diseased populations,” *NeuroImage*, vol. 49, no. 3, pp. 2457–2466, Feb. 2010.
- [41] Y. Sato *et al.*, “Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images,” *Med. Image Anal.*, vol. 2, no. 2, pp. 143–168, Jun. 1998.
- [42] C. V. Bowen, J. S. Gati, and R. S. Menon, “Robust prescan calibration for multiple spin-echo sequences: application to FSE and b-SSFP,” *Magn. Reson. Imaging*, vol. 24, no. 7, pp. 857–867, Sep. 2006.
- [43] B. P. Chugh, J. Bishop, Y.-Q. Zhou, J. Wu, R. M. Henkelman, and J. G. Sled, “Robust method for 3D arterial spin labeling in mice,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 68, no. 1, pp. 98–106, Jul. 2012.
- [44] P. A. Yushkevich *et al.*, “User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability,” *NeuroImage*, vol. 31, no. 3, pp. 1116–1128, Jul. 2006.
- [45] B. B. Avants, N. J. Tustison, G. Song, P. A. Cook, A. Klein, and J. C. Gee, “A reproducible evaluation of ANTs similarity metric performance in brain image registration,” *NeuroImage*, vol. 54, no. 3, pp. 2033–2044, Feb. 2011.

- [46] K. J. Friston, "Statistical Parametric Mapping," in *Neuroscience Databases*, Springer, Boston, MA, 2003, pp. 237–250.
- [47] M. Brett, J.-L. Anton, R. Valabregue, and J.-B. Poline, "Region of interest analysis using an SPM toolbox. [Abstract]. Presented at the 8th International Conference on Functional Mapping of the Human Brain, June 2–6, 2002, Sendai, Japan," Jan. 2006.
- [48] Wesson, D. W., Levy, E., Nixon, R. A., & Wilson, D. A. (2010). Olfactory Dysfunction Correlates with Amyloid- Burden in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Journal of Neuroscience*, 30(2), 505–514. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4622-09.2010>
- [49] Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31(1), 125–147. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.07.007>
- [50] Patrick Delafontaine-Martel, Joël Lefebvre, Rafat Damseh, Alexandre Castonguay, Pier-Luc Tardif, Frédéric Lesage, "Large scale serial two-photon microscopy to investigate local vascular changes in whole rodent brain models of Alzheimer's disease", *Proceedings of SPIE Vol. 10498*, 104982O (2018) SPIE Digital Library

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Le travail présenté dans ce mémoire a été possible grâce à la réalisation d'un système d'imagerie sériel utilisant comme phénomène physique la fluorescence par absorption deux-photons. La première partie de ce projet a été réalisée par la caractérisation et la mise en marche de l'appareil d'imagerie sériel. La mise sur pied de ce système automatique a permis la reconstruction histologique de plus de 30 cerveaux murins réalisant ainsi le second objectif étant d'observer le développement de la maladie au sein de trois groupes d'âge contenant chacun 10 cerveaux.

5.1 Objectif 1

Tout d'abord, la réalisation et la caractérisation de l'imageur ont été effectuées afin d'imager et de reconstruire en totalité des cerveaux murins. Toutefois, ce système d'imagerie peut permettre l'acquisition d'autres tissus biologiques. En effet, lors de la fixation des tissus dans la matrice d'agarose, il est possible d'insérer un autre tissu en respectant les limites dimensionnelles du moule d'agarose.

La mécanique de sectionnement des tissus reste cependant un facteur limitant de la méthode. Une coupe de tissus imprudente peut endommager la structure d'agarose provoquant ainsi une fixation déficiente de l'échantillon pour les tranches subséquentes. Or, il est important de bien contrôler les séquences de sectionnement. De plus, une épaisseur de coupe trop grande peut engendrer un déracinement de la matrice d'agarose du moule. Lorsque cela se produit, la récupération de l'échantillon complet est très difficile puisque l'oxydation de l'agarose cause une fixation chimique avec le tissu imagé. De plus, il faut considérer la rigidité des tissus biologiques. Le cerveau est un organe qui se coupe aisément grâce au montage. Cependant, des tissus plus rigides tels que le cœur, ou des aortes peuvent se déformer pendant le sectionnement causant des artéfacts de coupe sur la surface.

La réalisation de ce système a été possible grâce aux sources lasers femtosecondes permettant le déploiement d'une grande puissance de rayonnement. Cette particularité offre aussi la possibilité

d'implémenter d'autres styles de systèmes d'imagerie non linéaires. En effet, l'imagerie moléculaire ne se limite pas qu'à la perception de fluorophores dans un tissu préparé. En utilisant deux sources lasers, il est possible de mettre sur pied un système d'imagerie par effet Raman stimulé (SRS) ou par effet de spectroscopie Raman anti-Stokes cohérent (CARS). Ces méthodes d'imagerie permettent d'utiliser la densité d'une certaine vibration atomique comme source de contraste dans un tissu. Ceci permettrait effectuer de l'imagerie ayant comme contraste des chaînes moléculaires lipidiques permettant de différencier la matière blanche et la matière grise dans le cerveau par exemple. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes concentrés sur la microscopie deux-photons, car un système utilisant la microscopie de style Raman nécessiterait un temps d'acquisition prolongé du fait que les objectifs du microscope utilisés devraient être de magnitude plus élevée que 4x afin d'observer des structures plus fines telles que la gaine de myéline des neurones. Cette modalité reste toutefois compatible avec une modalité d'imagerie biphotonique. Dans le cadre d'un doctorat, la fabrication d'un de ces systèmes multimodaux serait réalisable.

5.2 Objectif 2

L'implémentation des filtres de segmentation présentée dans le cadre de ce travail a permis de mettre en évidence les structures tubulaires par le bien de filtres Sato à plusieurs échelles de grandeur et la segmentation par le calcul d'un seuil Otsu. La mise en place d'un pipeline de traitements contenant la reconstruction des données, la coregistration, la segmentation et la sélection des ROI a permis une facilité de travail bien au-delà d'une reconstruction manuelle. Cependant, des avenues récentes pourraient être à envisager pour améliorer la vitesse et la sensibilité de certaines parties de ce pipeline. En effet, la segmentation des vaisseaux sanguins pourrait être effectuée avec un réseau neuronal de traitement d'images. Par exemple, en prenant différents échantillons d'une taille pouvant représenter les données lors de l'acquisition, il serait possible de segmenter à la main les vaisseaux sanguins et d'utiliser ces masques comme échantillon d'entraînement. L'avantage de l'utilisation d'un tel système serait de considérer des milieux de différentes résolutions et d'obtenir une méthode de segmentation générale pour toutes les conditions d'imagerie du microscope. Ainsi, l'implémentation de techniques de segmentation différentes ne serait pas requise selon la profondeur à laquelle l'image a été acquise puisque la résolution est changeante lors de l'acquisition. De plus, pour éviter des traitements d'images seulement après l'acquisition, il serait possible de paralléliser la segmentation et l'acquisition. En

effet, lors de l'enregistrement de l'image, un second fil d'exécution pourrait appliquer la segmentation des vaisseaux sanguins comme présentée dans la méthodologie ou par réseau neuronal. Ceci aurait pour effet de diminuer le temps d'analyse puisque le travail serait déjà effectué.

Au niveau de la coregistration, on doit souligner qu'elle n'est pas précise au pixel près. Effectivement, la librairie ANTS permet une bonne superposition des deux images, mais il est possible que l'alignement ne soit pas parfait lorsqu'il y a apparition d'artéfacts. Nous utilisons l'information mutuelle comme métrique de superposition avec des pas de calibrations variant durant les différentes étapes de coregistration. Or, si les pas utilisés sont trop grands lors de la superposition rigide, il est possible que les transformations non linéaires ne puissent pas corriger les défauts apportés par l'étape précédente. Ainsi, des erreurs cumulatives difficiles à corriger peuvent se faufiler dans le processus et causer des sélections de ROI moins précises.

D'autre part, il faut mentionner que la technique de segmentation utilisée dans l'article présenté cause un amincissement des vaisseaux sanguins provoquant une diminution de la densité vasculaire sanguine. En effet, le filtre Sato considère la seconde dérivée de l'image et ne conserve que les valeurs négatives. Ainsi, les bordures des vaisseaux sanguins sont supprimées puisque la montée du signal correspond à une seconde dérivée plus grande que zéro. C'est pourquoi lorsqu'on compare les résultats présentés avec la littérature, nous pouvons observer une différence de l'ordre de 1% pour les densités vasculaires sanguines.

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce mémoire se place dans la discipline de l'histologie où un besoin de comprendre les changements d'un point de vue microscopique et dans le cerveau entier reliés à la maladie d'Alzheimer est présent. Les chercheurs dans le domaine de la biologie et en médecine font appel aux récentes avancées dans le domaine de la microscopie afin d'accumuler des observations et pouvoir étudier les changements présents lors du développement de la maladie. Ce projet intersecte alors des intérêts communs au domaine de la médecine et de l'ingénierie. Le système conçu dans le cadre de cette maîtrise permet d'imager à grande échelle de nombreux cerveaux murins. Cependant, l'utilisation de la microscopie deux-photons se limite qu'aux phénomènes de fluorescence.

De nos jours, la disponibilité accrue des sources lasers et la compréhension des phénomènes relatifs à ceux-ci sont de plus en plus présentes dans les domaines de la médecine et la biologie. L'utilisation des phénomènes moléculaires quantiques tels que la diffusion Raman est un outil de choix afin de repérer et d'obtenir un contraste provenant de tissus ayant des fonctions biologiques différentes ou des compositions chimiques diverses. Aujourd'hui, plusieurs équipes utilisent ce phénomène pour cartographier des tissus biologiques selon leurs compositions ou afin d'obtenir de l'information moléculaire. Dans le cadre de ce projet, il aurait été intéressant de combiner une méthode d'imagerie non linéaire supplémentaire, telle que l'imagerie CARS ou SRS, afin de superposer une carte de contraste basée sur les vibrations atomiques des lipides ouvrant la possibilité de localiser les zones de matière blanche et de matière grise. Cependant, ce style d'imagerie vient avec son lot de défis (l'alignement temporel et spatial des pulses lasers, la création d'un faisceau laser afin de sonder la matière, etc.) et serait approprié à la réalisation d'un projet doctoral combinant les différents styles de modalités.

Le but de la microscopie sérielle est la capacité de pouvoir traiter des tissus humains et permettre l'observation de la maladie d'Alzheimer directement dans le cerveau de notre espèce pour réduire l'erreur commise par les observations interspèces. Cependant, la grandeur de ce type d'échantillon se révèle un défi d'ingénierie de taille où l'accumulation de ces données et l'analyse nécessitent des architectures informatiques sophistiquées pour rendre la recherche possible.

BIBLIOGRAPHIE

- Aaron, S. R. and H. (n.d.). 1P vs 2P fluorescence imaging. Retrieved from <http://microscopy.berkeley.edu/courses/TLM/2P/index.html>
- Alexandros A. Lavda. (n.d.). Two Photon Confocal Microscopy: What it is and How to Use it to Your Advantage. Retrieved from <https://bitesizebio.com/19937/two-photon-confocal-microscopy-what-it-is-and-how-to-use-it-to-your-advantage/>
- Allen Institute for Brain Science. (2015). Allen Mouse Common Coordinate Framework. *Technical White Paper*, (May), 1–18.
- Amato, S. P., Pan, F., Schwartz, J., & Ragan, T. M. (2016). Whole Brain Imaging with Serial Two-Photon Tomography. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 31. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00031>
- Amunts, K., Lepage, C., Borgeat, L., Mohlberg, H., Dickscheid, T., Rousseau, M. É., ... Evans, A. C. (2013). BigBrain: An ultrahigh-resolution 3D human brain model. *Science*, 340(6139), 1472–1475. <https://doi.org/10.1126/science.1235381>
- Anderson, D. (n.d.). Allen Brain Atlas. Retrieved from <http://www.brain-map.org/>
- Avants, B. B., Tustison, N., & Song, G. (2009). Advanced Normalization Tools (ANTs). *Insight Journal*, 1–35. Retrieved from <ftp://ftp3.ie.freebsd.org/pub/sourceforge/a/project/ad/advants/Documentation/ants.pdf>
- Briggman, K. L., Helmstaedter, M., & Denk, W. (2011). Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature*, 471(7337), 183–190. <https://doi.org/10.1038/nature09818>
- Buee, L., Hof, P. R., & Delacourte, A. (1997). Brain microvascular changes in Alzheimer's disease and other dementias. *Ann N Y Acad Sci*, 826(0), 7–24. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9329677
- Callen, D. J. A., Black, S. E., Gao, F., Caldwell, C. B., & Szalai, J. P. (2001). Beyond the hippocampus. *Neurology*, 57(9), 1669–1674. <https://doi.org/10.1212/WNL.57.9.1669>
- CASTONGUAY, A. (2017). *HISTOLOGIE MASSIVE BASÉE SUR LA MICROSCOPIE À*

TOMOGRAPHIE PAR COHÉRENCE OPTIQUE. ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL.

- Cheong, W.-F., Prael, S. A., & Welch, A. J. (1990). A Review of the Optical Properties of Biological Tissues. *Ieee Journal of Quantum Electronics*, 26(12), 2166–2185. <https://doi.org/10.1109/3.64354>
- Cifuentes, D., Poittevin, M., Dere, E., Broquères-You, D., Bonnin, P., Benessiano, J., ... Lévy, B. I. (2015). Hypertension accelerates the progression of Alzheimer-like pathology in a mouse model of the disease. *Hypertension*, 65(1), 218–224. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04139>
- Cohen, J. D., Perlstein, W. M., Braver, T. S., Nystrom, L. E., Noll, D. C., Jonides, J., & Smith, E. E. (1997). Temporal dynamics of brain activation during a working memory task. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/386604a0>
- Dale, A. M., Liu, A. K., Fischl, B. R., Buckner, R. L., Belliveau, J. W., Lewine, J. D., & Halgren, E. (2000). Dynamic Statistical Parametric Mapping: Combining fMRI and MEG for High-Resolution Imaging of Cortical Activity. *Neuron*, 26(1), 55–67. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81138-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81138-1)
- De La Torre, J. C. (2004). Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *Lancet Neurology*, 3(3), 184–190. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00683-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00683-0)
- de Leeuw, F., Barkhof, F., & Scheltens, P. (2004). White matter lesions and hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *Neurology*, 62(2), 310 LP-312. Retrieved from <http://n.neurology.org/content/62/2/310.abstract>
- Denk, W., Strickler, J., & Webb, W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73–76. <https://doi.org/10.1126/science.2321027>
- Fondation pour la recherche médicale. (n.d.). Retrieved from <https://www.frm.org/alzheimer/alzheimer-en-chiffres.html>
- Frangi, A. F., Niessen, W. J., Vincken, K. L., & Viergever, M. A. (1998). Multiscale vessel enhancement filtering, 1496, 130–137. <https://doi.org/10.1007/BFb0056195>

- Friston, K. (2003). Introduction to Statistical Parametric Mapping. Retrieved from http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/doc/intro/#_I_Introduction
- Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, (65), 1–9. <https://doi.org/10.3791/3564>
- Gilbert Grynberg, A. A. and C. F. (2010). *Introduction to quantum optics* (First). Cambridge University Press.
- Goense, J., Bohraus, Y., & Logothetis, N. K. (2016). fMRI at High Spatial Resolution: Implications for BOLD-Models. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 10(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncom.2016.00066>
- Gong S. Zheng C., D. M. L. et al. (2003). A gene expression atlas of the central nervous system based on artificial chromosomes. *Nature*, 425(6961), 917–925.
- Göppert-Mayer, M. (1931). Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen Der Physik*, 401(3), 273–294. <https://doi.org/10.1002/andp.19314010303>
- Hagler, D. J., Ahmadi, M. E., Kuperman, J., Holland, D., McDonald, C. R., Halgren, E., & Dale, A. M. (2009). Automated white-matter tractography using a probabilistic diffusion tensor atlas: Application to temporal lobe epilepsy. *Human Brain Mapping*, 30(5), 1535–1547. <https://doi.org/10.1002/hbm.20619>
- Hardy, J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*, 256(5054), 184.
- Harms, M. (2010). Martin Bland, An Introduction to Medical Statistics (3rd ed.). *Physiotherapy*, 96, 82.
- Hawrylycz, M. J., Lein, E. S., Guillozet-Bongaarts, A. L., Shen, E. H., Ng, L., Miller, J. A., ... Jones, A. R. (2012). An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature*, 489(7416), 391–399. <https://doi.org/10.1038/nature11405>
- Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, 2(12), 932–940. <https://doi.org/10.1038/nmeth818>

- Jacques, S. L. (2013). Erratum: Optical properties of biological tissues: A review (Physics in Medicine and Biology (2013) 58). *Physics in Medicine and Biology*, 58(14), 5007–5008. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/14/5007>
- Kirbas, C. Quek, F. (2004). A review of vessel extraction techniques and algorithms. *Computing Surveys*, 36(2), 81–121. <https://doi.org/10.1145/1031120.1031121>
- Kitazawa, M., Medeiros, R., & M. LaFerla, F. (2012). Transgenic Mouse Models of Alzheimer Disease: Developing a Better Model as a Tool for Therapeutic Interventions. *Current Pharmaceutical Design*, 18(8), 1131–1147. <https://doi.org/10.2174/138161212799315786>
- Lecun, Y. (1998). THE MNIST DATABASE. Retrieved from <http://yann.lecun.com/exdb/mnist/>
- Lecun, Y., Bengio, Y., & Hinton, G. (2015). Deep learning. *Nature*, 521(7553), 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature14539>
- Lefebvre, J., Castonguay, A., Pouliot, P., Descoteaux, M., & Lesage, F. (2017). Whole mouse brain imaging using optical coherence tomography: reconstruction, normalization, segmentation, and comparison with diffusion MRI. *Neurophotonics*, 4(4), 41501. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.4.4.041501>
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., ... Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), 168–176. <https://doi.org/10.1038/nature05453>
- Leonelli, R. (2014). *Optique et ondes électromagnétique* (10th ed.). Montréal: Université de Montréal.
- Lesage, D., Angelini, E. D., Bloch, I., & Funka-Lea, G. (2009). A review of 3D vessel lumen segmentation techniques: Models, features and extraction schemes. *Medical Image Analysis*, 13(6), 819–845. <https://doi.org/10.1016/j.media.2009.07.011>
- Lipinski, C., & Hopkins, a. (2004). For Biology and Medicine. *Nature*, 432(November), 855–861.
- Madisen, L., Garner, A. R., Shimaoka, D., Chuong, A. S., Klapoetke, N. C., Li, L., ... Zeng, H. (2015). Transgenic mice for intersectional targeting of neural sensors and effectors with high specificity and performance. *Neuron*, 85(5), 942–958. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.022>

- Martinez-Perez, M. E., Hughes, A. D., Thom, S. A., Bharath, A. A., & Parker, K. H. (2007). Segmentation of blood vessels from red-free and fluorescein retinal images. *Medical Image Analysis*, 11(1), 47–61. <https://doi.org/10.1016/j.media.2006.11.004>
- Muller, M. (n.d.). *Confocal Fluorescence microscopy* (Second). SPIE press. Retrieved from <https://books.google.ca/books?id=t7N4G4x9zGcC&pg=PA10&lpg=PA10&dq=PSF+confocal&source=bl&ots=3VNY7PnTK5&sig=WkgKv09LnzQ7z-lglNGcatytDpg&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwio7q2EzKPZAhXq7YMKHdDaDNMQ6AEIsQEwDw#v=onepage&q=PSF confocal&f=false>
- Nasr-Esfahani, E., Karimi, N., Jafari, M. H., Soroushmehr, S. M. R., Samavi, S., Nallamothu, B. K., & Najarian, K. (2018). Segmentation of vessels in angiograms using convolutional neural networks. *Biomedical Signal Processing and Control*, 40, 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2017.09.012>
- Nathan Herrmann Sarah A. Chau Ida Kircanski Krista L. Lanctôt. (2011). Current and Emerging Drug Treatment Options for Alzheimer's Disease. *Springer*, 71(15), 2031–2065.
- Neutrom. (n.d.). BASICS OF AFFINE TRANSFORMATION. Retrieved from <https://neutrium.net/mathematics/basics-of-affine-transformation/>
- Odgaard, A., K. Andersen, F. Melsen, and H. J. G. (1990). A Direct Method for Fast Three-Dimensional Serial Reconstruction. *Journal of Microscopy*, 159(335), 42.
- Pantanowitz, L. (2010). Digital images and the future of digital pathology. *Journal of Pathology Informatics*, 1(1), 15. <https://doi.org/10.4103/2153-3539.68332>
- Preibisch, S., & Saalfeld, S. (2008). Fast stitching of large 3d biological datasets. *Proceedings of the ImageJ User and Developer Conference*. Retrieved from <http://becherovka.mpi-cbg.de/~preibisch/pubs/imagejpaper2008.pdf%5Cnfile:///Users/franco/Documents/Papers2/Articles/Unknown/Proceedings of the ImageJ ?/Preibisch/Proceedings of the ImageJ ? Fast stitching of large 3d biological datasets.pdf%5Cnpapers2://>
- Quon, D. (1991). Formation of beta-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature*, 352(6332), 239–241. <https://doi.org/10.1038/352239a0>
- R.H., W. (1996). Confocal optical microscopy: Reports on progress in physics. *Rep. Prog. Phys*, 59(427), 427–471.

- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., ... Jucker, M. (2006). A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Reports*, 7(9), 940–946. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400784>
- Ragan, T., Kadiri, L. R., Venkataraju, K. U., Bahlmann, K., Sutin, J., Taranda, J., ... Osten, P. (2012). Serial two-photon tomography for automated *ex vivo* mouse brain imaging. *Nature Methods*, 9(3), 255–258. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1854>
- Richter, T., Sattler, M., Wiesendanger, R., Wittern, K.-P., & Wepf, R. (2003). Frozen hydrated bloc-face investigation of tissue for Cryo SEM. *Microscopy and Microanalysis*, 9(S03), 504–505. <https://doi.org/10.1017/S1431927603031064>
- Ruparel, N. H., Shahane, N. M., & Bhamare, D. P. (2013). Learning from Small Data Set to Build Classification Model : A Survey. *International Conference on Recent Trends in Engineering & Technology*, 2013(x), 975 – 8887.
- Ryan, L., Nadel, L., Keil, K., Putnam, K., Schnyer, D., Trouard, T., & Moscovitch, M. (2001). Hippocampal complex and retrieval of recent and very remote autobiographical memories: Evidence from functional magnetic resonance imaging in neurologically intact people. *Hippocampus*, 11(6), 707–714. <https://doi.org/10.1002/hipo.1086>
- Salomone, S., Caraci, F., Leggio, G. M., Fedotova, J., & Drago, F. (2012). New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer’s disease: Focus on disease modifying drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 73(4), 504–517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.04134.x>
- Scalettar, B. A., Swedlow, J. R., Sedat, J. W., & Agard, D. A. (1996). Dispersion, aberration and deconvolution in multi-wavelength fluorescence images. *Journal of Microscopy*, 182(1), 50–60. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.1996.122402.x>
- Schaeffer, E. L., Figueiró, M., Wagner, I., & Gattaz, F. (2011). Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics*, 66(S1), 45–54. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011001300006>
- Simpson, C. R., Kohl, M., & Essenpreis, M. (1998). Near-infrared optical properties of *ex vivo* human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique. *Phys. Med. Biol. Phys. Med. Biol.*, 43(43), 2465–2478.

9155/43/9/003

- Smith, P., Reid, D. B., Environment, C., Palo, L., Alto, P., & Smith, P. L. (1979). Smith et al. - 1979 - A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms, *20*(1), 62–66. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076>
- Sood, S. K. and A. K. (n.d.). Femtosecond Laser Spectroscopy Group. Retrieved from <http://web.iitd.ac.in/~kumarsunil/research.html>
- Statistique de la maladie d'Alzheimer au Canada. (n.d.). Retrieved from <http://www.alzheimer.ca/fr/Home/About-dementia/What-is-dementia/Dementia-numbers>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*, 655. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3785>
- Strickland, D., & Mourou, G. (1985). Compression of amplified chirped optical pulses. *Optics Communications*, *56*(3), 219–221. [https://doi.org/10.1016/0030-4018\(85\)90120-8](https://doi.org/10.1016/0030-4018(85)90120-8)
- Tsai, P. S., Kaufhold, J. P., Blinder, P., Friedman, B., Drew, P. J., Karten, H. J., ... Kleinfeld, D. (2009). Correlations of Neuronal and Microvascular Densities in Murine Cortex Revealed by Direct Counting and Colocalization of Nuclei and Vessels. *Journal of Neuroscience*, *29*(46), 14553–14570. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3287-09.2009>
- Vagnucci, A. H., & Li, W. W. (2003). Alzheimer's disease and angiogenesis. *Lancet*, *361*(9357), 605–608. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12521-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12521-4)
- Wang, L. V., Wu, H.-I. (2007). *Biomedical Optics : Principles and Imaging*. NJ, USA: Wiley interscience.
- Wang, lihong V. (2007). *Biomedical optics, principles and imaging*.
- Xu, C., & Webb, W. W. (1996). Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *Journal of the Optical Society of America B*, *13*(3), 481. <https://doi.org/10.1364/JOSAB.13.000481>
- Yoshinobu Sato, S. N. (1998). 3D Multi-Scale Line Filter for Segmentation and Visualization of Curvilinear Structures in Medical Images, *2*(2), 143–168. Retrieved from <http://citeseer.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.55.3374>

Zhang, B., & Zerubia, J. (2007). Point-Spread Function Models, *46*(10), 1819–1829.

Zhou, Y., Chan, K. K. H., Lai, T., & Tang, S. (2013). Characterizing refractive index and thickness of biological tissues using combined multiphoton microscopy and optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, *4*(1), 38. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.000038>