

Titre: Approches microscopiques pour l'étude de la fonction
Title: microvasculaire cérébrale

Auteur: Patrick Delafontaine-Martel
Author:

Date: 2023

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Delafontaine-Martel, P. (2023). Approches microscopiques pour l'étude de la
Citation: fonction microvasculaire cérébrale [Ph.D. thesis, Polytechnique Montréal].
PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/57095/>

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/57095/>
PolyPublie URL:

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

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Approches microscopiques pour l'étude de la fonction microvasculaire cérébrale

PATRICK DELAFONTAINE-MARTEL

Institut de génie biomédical

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiae Doctor*

Génie biomédical

Décembre 2023

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

Approches microscopiques pour l'étude de la fonction microvasculaire cérébrale

présentée par **Patrick DELAFONTAINE-MARTEL**
en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiae Doctor*
a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Jean PROVOST, président

Frédéric LESAGE, membre et directeur de recherche

Frédéric LEBLOND, membre

Ravi RUNGTA, membre externe

DÉDICACE

*À notre famille qui grandit et qui voit naître
nos plus formidables projets.*

REMERCIEMENTS

Dans le cadre de cette péripétie de ma vie, j'ai pu m'entretenir avec des collègues, des amis et des personnes merveilleuses qui m'ont fait découvrir la vie au travail et le plaisir que celle-ci peut procurer. Je tiens à nommer, afin de les remercier, tous les collègues avec lesquels j'ai pu échanger au cours de mon parcours et qui ont su me faire rire. Samuel Bélanger, Joël Lefebvre, Alexandre Castonguay, Christophe Cloutier-Tremblay, Pier-Luc Tardif, Yuankang Lu, Cong Zang, Paul James Marchand, Xuecong Lu, Rafat Damseh, Antoine Létourneau, Maxime Abran, Marleen E. Bakker, Frans Irgolitsch, Valérie Daigneault, Enzo Delamarre, Émile Dessurealt, et si j'en oublie, c'est parce que tant de personnes mériteraient d'être remerciées.

Je tiens à exprimer ma gratitude tout particulièrement envers ma famille proche : mon père, Michel Martel ; ma mère, Guylaine Delafontaine ; et ma sœur, Mylène Delafontaine Martel. Ils ont su m'épauler et me faire sentir soutenu dans les moments difficiles traversés au cours de ce périple éducatif.

Je souhaite souligner l'importance de mon directeur de recherche, Frédéric Lesage, dans tous les travaux que j'ai accomplis. Il a su me guider de manière experte à travers les différentes spécialisations que j'ai acquises au cours de mon parcours au cycle supérieur au sein de son laboratoire. Son énergie, son ingéniosité, son originalité et sa rigueur exemplaire ne peuvent être que source d'inspiration, un modèle que j'espère un jour pouvoir reproduire.

Aucun remerciement ne serait complet sans mentionner ma conjointe, mon inspiration quotidienne, ma muse, ma seconde moitié, Elissa Malo, qui a su par-dessus tout me convaincre d'aller jusqu'au bout de cet accomplissement malgré les difficultés. Tu as su me faire persévérer au-delà de ce que j'aurais pu accomplir seul. De plus, tu m'as offert la plus belle expérience de mon parcours de vie, celle d'être père de deux jeunes filles, Charlotte et Béatrice, qui sont intelligentes, adorables et qui me donne par-dessus toutes les meilleures raisons d'apprécier la vie au quotidien. Sans vous ma famille, je ne serais pas l'homme que je suis aujourd'hui.

À vous tous.

RÉSUMÉ

Les liens entre la santé vasculaire et la santé neurologique sont supportés par plusieurs corrélations dans la littérature. Des évidences telles que le déclin cognitif suivant les AVC, l'observation de la diminution d'irrigation corticale dans différentes pathologies comme l'Alzheimer et la démence ou la corrélation entre les maladies cardio-vasculaires et neurodégénératives, témoigne de l'importance de développer des outils de recherche afin de comprendre les liens sous-jacents à ces corrélations. Dans le cadre de ce travail de synthèse, le développement d'outils afin de perturber les fonctions vasculaires ainsi que le développement d'un système d'imagerie a été choisi afin d'approfondir les connaissances dans ces domaines respectifs.

En ce qui a trait à la perturbation des fonctions vasculaires, la mise sur pied et l'analyse d'une méthodologie utilisant le Rose bengal comme agent de contraste et comme agent photothrombotique combiné à l'excitation multiphotonique ont été effectuées. La méthode a démontré qu'elle peut causer des blocages vasculaires transitoire pendant moins de 24 heures à une profondeur maximale de 300 μm sous la surface corticale. Ces observations sont corroborées par l'imagerie OCT vasculaire. Le développement de cette méthodologie offre une nouvelle voie d'exploration afin de bloquer des vaisseaux sanguins dans le cortex murin tout en assurant un effet local de l'excitation de l'agent photothrombotique.

Afin d'approfondir les connaissances quant aux appareils de microscopie, la conceptualisation, la mise en marche, la caractérisation et la mise à l'épreuve d'un système de microscopie confocal par réflectance ont été effectuées. Cette démarche a permis de mettre en lumière une nouvelle méthode afin de cartographier l'architecture sanguine, exploiter l'augmentation de contraste que procure le contraste de phase et implémenter une méthodologie se reposant sur l'imagerie profonde des tissus biologiques. Cette dernière se reposant sur l'utilisation de la bande spectrale NIR-II permet la visualisation de cellules corticales et des vaisseaux sanguins jusqu'à 800 μm sous la surface corticale au niveau du cortex somato-sensoriel. De plus cette technologie a démontré la possibilité d'effectuer de l'observation du passage d'érythrocytes singuliers dans le lumen des vaisseaux. La mise en marche d'un tel système est cependant sujette à quelques améliorations afin d'assurer une imagerie rapide en temps réel afin d'ouvrir la voie vers des études à vocation physiologique.

ABSTRACT

The connections between vascular health and neurological health are supported by several correlations in the literature. Evidence such as cognitive decline following strokes, the observation of decreased cortical blood flow in various conditions like Alzheimer's and dementia, or the correlation between cardiovascular diseases and neurodegeneration underscores the importance of developing research tools to understand the underlying links behind these correlations. As part of this thesis, the development of tools to disrupt vascular functions and the creation of imaging systems have been chosen to further our understanding in these respective fields.

Regarding the disruption of vascular functions, the establishment and analysis of a methodology using Rose Bengal as a contrast agent and as a photothrombotic agent combined with multiphoton excitation have been carried out. The method has demonstrated that it can induce transient vascular blockages for less than 24 hours at a maximum depth of 300 μm beneath the cortical surface. These observations are supported by vascular OCT imaging. The development of this methodology offers a new avenue for exploring the blocking of blood vessels in the murine cortex while ensuring a localized effect of the photothrombotic agent excitation.

To deepen our understanding of microscopy devices, the conceptualization, setup, characterization, and testing of a reflectance confocal microscopy system were carried out. This approach has revealed a novel method for mapping vascular architecture, harnessing the increased contrast provided by phase contrast, and implementing a methodology based on deep imaging of biological tissues. The latter, relying on the use of the NIR-II spectral band, enables the visualization of cortical cells and blood vessels up to 800 μm beneath the cortical surface in the somatosensory cortex. Furthermore, this technology has demonstrated the possibility of observing the passage of individual erythrocytes within vessel lumens. However, the operation of such a system is subject to some improvements to ensure real-time imaging for physiological studies.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----|
| DÉDICACE..... | III |
| REMERCIEMENTS | IV |
| RÉSUMÉ..... | V |
| ABSTRACT | VI |
| TABLE DES MATIÈRES | VII |
| LISTE DES FIGURES..... | XII |
| LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS | XIV |
| LISTE DES ANNEXES | XV |
| CHAPITRE 1 INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 Contexte et problématique..... | 1 |
| 1.1.1 La microscopie vasculaire corticale | 1 |
| 1.1.2 Les micro-occlusions vasculaires transitoire..... | 3 |
| 1.2 Objectifs de recherche | 4 |
| 1.3 Autres contributions | 5 |
| CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE..... | 8 |
| 2.1 Propriétés optiques des tissus biologiques..... | 8 |
| 2.1.1 Modélisation de la lumière..... | 8 |
| 2.1.2 Les interactions lumière-matière..... | 10 |
| 2.1.2.1 Les équations de Fresnel | 10 |
| 2.1.2.2 L'atténuation optique dans les milieux | 12 |
| 2.1.2.3 La fluorescence multiphotonique | 15 |
| 2.2 La microscopie par réflectance confocale | 19 |
| 2.2.1 Théorie | 19 |

| | | |
|-------------------------------|---|----|
| 2.2.2 | Résolution axiale et latéral d'un système confocal | 20 |
| 2.3 | Méthodes de microscopie supplémentaires | 24 |
| 2.3.1 | La tomographie par cohérence optique | 24 |
| 2.3.2 | La microscopie deux photons..... | 27 |
| 2.4 | La photothrombose | 31 |
| 2.4.1 | Principes d'activation..... | 31 |
| 2.4.2 | Utilisations scientifiques et limitations | 33 |
| 2.5 | Les blocages vasculaires transitoires | 34 |
| 2.5.1 | Fonctions vasculaires | 35 |
| 2.5.2 | Observations et mécanismes | 35 |
| CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE | | 38 |
| 3.1 | Système de microscopie par réflectance confocal | 38 |
| 3.1.1 | Exigences et contraintes générales | 38 |
| 3.1.2 | Conception et considérations optiques..... | 40 |
| 3.1.3 | Exigences optomécaniques | 44 |
| 3.1.4 | Acquisition des images..... | 44 |
| 3.1.5 | Procédure d'alignement..... | 46 |
| 3.2 | Système bimodal : multiphoton et tomographie par cohérence optique | 47 |
| 3.2.1 | Aperçu du système | 47 |
| 3.2.2 | Procédure d'alignement du système bimodal..... | 49 |
| 3.3 | Chirurgies crânielles pour fin d'imagerie | 49 |
| 3.3.1 | Procédure d'anesthésie | 50 |
| 3.3.2 | Craniotomie pour séance d'imagerie aiguë (microscopie par réflectance confocale) | 51 |
| 3.3.3 | Craniotomie pour séance d'imagerie chronique (microscopie deux photons et OCT) | 51 |

| | |
|--|----|
| CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : TARGETTED CAPILLARY PHOTOTHROMBOSIS VIA MULTIPHOTON EXCITATION OF ROSE BENGAL | 54 |
| 4.1 Introduction | 55 |
| 4.2 Material and Methods..... | 57 |
| 4.2.1 Animal groups | 57 |
| 4.2.2 Cranial surgery | 58 |
| 4.2.3 Multiphoton photothrombosis imaging sessions..... | 59 |
| 4.2.4 Histology | 59 |
| 4.2.5 Exclusion criterion | 60 |
| 4.3 Results | 60 |
| 4.3.1 Multiphoton excitation of Rose Bengal for photothrombosis..... | 60 |
| 4.3.2 Insults etiology | 62 |
| 4.3.3 Speed-flux correlation conservation..... | 63 |
| 4.3.4 Multimodal imaging of capillary events | 64 |
| 4.3.5 Insults dynamics | 66 |
| 4.3.6 Insult duration | 66 |
| 4.3.7 Targeted photo-occlusions leads to larger distances between vessels | 67 |
| 4.3.8 Histological markers | 69 |
| 4.4 Discussion | 71 |
| 4.4.1 Dye characterisation..... | 71 |
| 4.4.2 RBC speed flux correlation and transient behavior | 71 |
| 4.4.3 Insults mechanism | 72 |
| 4.4.4 Advantages of multiphoton photothrombosis | 73 |
| 4.4.5 Limitations | 73 |
| 4.4.6 Future experiments..... | 74 |

| | |
|--|----|
| 4.5 Conclusion..... | 75 |
| 4.5.1 Acknowledgement..... | 75 |
| 4.5.2 Author contribution statement..... | 76 |
| 4.5.3 Disclosure/conflict of interest | 76 |
| 4.6 Références | 76 |
| CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : PHASE CONTRAST REFLECTANCE CONFOCAL BRAIN IMAGING AT 1650 NM | 80 |
| 5.1 Introduction | 81 |
| 5.2 Methodology | 82 |
| 5.2.1 Animal groups and surgery | 82 |
| 5.2.2 Optical system..... | 83 |
| 5.2.3 Repeated line acquisition scheme | 85 |
| 5.3 Results | 85 |
| 5.3.1 Optical system characterisation..... | 85 |
| 5.3.2 Phase contrast imaging can distinguish individual cell bodies | 86 |
| 5.3.3 Temporal analysis provides clear vascular map..... | 87 |
| 5.3.4 Vascular components can be retrieved up to 800 um deep | 90 |
| 5.3.5 Erythrocytes can be monitored..... | 91 |
| 5.3.6 Intact skull imaging can also retrieve cortical cells | 91 |
| 5.4 Discussion | 93 |
| 5.4.1 Visible structures from the phase contrast reflectance confocal microscope..... | 93 |
| 5.4.2 Repetive image acquisition can provide a vascular map..... | 94 |
| 5.4.3 Phase contrast scheme may degrade discerning power deep in the tissue | 94 |
| 5.4.4 Decent imaging of cortical structures through the skull | 94 |
| 5.4.5 Limitations | 95 |

| | |
|-------------------------------------|-----|
| 5.5 Conclusion..... | 95 |
| 5.6 Disclaimer | 95 |
| 5.7 Data availability | 96 |
| 5.8 Acknowledgment | 96 |
| 5.8 Références | 96 |
| CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE..... | 98 |
| 6.1 Objectif 1 | 98 |
| 6.2 Objectif 2..... | 100 |
| 6.3 Travaux Futurs | 101 |
| CHAPITRE 7 CONCLUSION..... | 103 |
| BIBLIOGRAPHIE | 104 |
| ANNEXE | 113 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 2.1 Représentation graphique dans le domaine de valeurs réelles d'une onde électromagnétique figée dans le temps..... | 9 |
| Figure 2.2 Représentation schématique de l'interaction aux interfaces entre deux milieux de propagations d'une onde électromagnétique..... | 11 |
| Figure 2.3 Représentation graphique de l'atténuation optique selon la longueur d'onde d'excitation..... | 14 |
| Figure 2.4 Présentation du mécanisme de la fluorescence..... | 17 |
| Figure 2.5 Présentation de la fluorescence multiphotonique..... | 18 |
| Figure 2.6 Illustration schématique d'un système confocal..... | 20 |
| Figure 2.7 La fonction de transfert optique dépendante du diamètre du sténopé de détection..... | 23 |
| Figure 2.8 Principe de base de la tomographie par cohérence optique..... | 25 |
| Figure 2.9 Schéma simple d'un montage deux photons..... | 28 |
| Figure 2.10 Illustration démontrant le protocole de photothrombose et le blocage résultant de l'excitation optique de l'agent photothrombotique dans le sang..... | 32 |
| Figure 2.11 Illustration montrant l'excitation hors plan d'imagerie causée par le trajet optique de la source..... | 34 |
| Figure 3.1 Présentation des considérations générales..... | 39 |
| Figure 3.2 Présentation physique du système d'imagerie..... | 43 |
| Figure 3.3 Exemple de signaux électriques en rampe envoyés aux miroirs galvanométriques dans le cadre d'une acquisition d'image..... | 45 |
| Figure 3.4 Présentation du système bimodale sous forme de schéma..... | 48 |
| Figure 3.5 Présentation de la plateforme de surveillance de signes vitaux..... | 52 |
| Figure 3.6 Présentation schématique de la chirurgie crâniale et de la fixation de la tête..... | 53 |
| Figure 4.1 Overall view of the imaging system..... | 65 |
| Figure 4.2 Examples of different blood flow dynamics in different capillaries via ocma..... | 69 |

| | |
|---|----|
| Figure 4.3 Immunofluorescence from 4 protein expressions is performed and shown to investigate the mechanism of the insults performed | 71 |
| Figure 5.1 Schematic presentation of the reflectance confocal microscope designed in this work | 85 |
| Figure 5.2 Imaging capabilities and phase contrast imaging at different depths. | 87 |
| Figure 5.3 Raw images and signal processing routine from the reflective confocal microscope with a phase contrast scheme. | 89 |
| Figure 5.4 Demonstration of vascular component retrieval at different depths..... | 90 |
| Figure 5.5 Demonstration of erythrocyte monitoring. | 91 |
| Figure 5.6 Comparison between imaging through intact skull and a cranial window. | 92 |

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

| | |
|--------|--|
| AVC | Accident Vasculaire Cérébral/Cérébraux |
| ICAM-1 | Molécule d'adhésion intermoléculaire 1 |
| ISC | Influx Sanguin Cérébral |
| Ly6G | Antigène 6 des lymphocytes de famille G |
| mAVC | Micro Accident Vasculaire Cérébral/Cérébraux |
| NIR | Proche infra-rouge |
| NIR-II | Proche infra-rouge 2 |
| OCT | Tomographie par cohérence optique |
| UV | Ultraviolet |
| VCAM-1 | Molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 |

LISTE DES ANNEXES

| | |
|--|-----|
| Annexe : Procédure d'alignement du microscope par réflectance confocal | 113 |
|--|-----|

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte et problématique

Dans notre société continuellement plus développée au niveau des soins médicaux, nous sommes confrontés à des pathologies ayant un taux d'incidence croissant avec le vieillissement de la population. Quelques-unes de ces pathologies sont en fait des neuropathologies telles que l'Alzheimer, la démence, la démence vasculaire ou les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Ces conditions médicales sont d'un grand intérêt scientifique avec pour but d'en déceler les mécanismes pour prévenir l'apparition des symptômes et d'y remédier.

Dans chacune de ces maladies, une observation commune est effectuée, il y a implication du système sanguin. Dans le cas des AVC, la cause du blocage sanguin peut être reliée à de multiples facteurs tels que la création d'un caillot sanguin ou la lésion d'une plaque d'athérosclérose. Dans les maladies dégénératives (Alzheimer ou démence), il est observé une perte de la matière neuronale par dégénération des neurones ainsi que des changements morphologiques des vaisseaux sanguins (J.C. De La Torre, 2004). Cependant, une observation secondaire regroupant ces conditions médicales a été faite, il y a confirmation histologique de l'apparition de sites microscopiques de blocages vasculaires (mAVC) (Brundel, 2012). Ces derniers sont difficiles à observer dans un contexte clinique puisqu'ils sont spatialement confinés (sous-millimétrique) et que les instruments d'imagerie clinique tels que l'imagerie par résonance magnétique ou l'imagerie par rayon X n'ont pas la capacité d'imager avec une telle résolution spatiale. Ainsi, l'utilisation des techniques d'imagerie spécialisées est une approche priorisée pour l'observation microscopique de ce phénomène vasculaire.

1.1.1 La microscopie vasculaire corticale

Afin de permettre l'observation directe des vaisseaux sanguins au niveau du cerveau, différentes techniques de microscopie ont été développées dans des modèles de recherche avec les animaux. Plusieurs techniques se basant sur des propriétés intrinsèques aux tissus biologiques telles que la tomographie par cohérence optique (OCT) (David Huang, 1991), l'imagerie par réflectance confocale (Fei Xia et al, 2018) ou la microscopie multiphotonique (Steffen Dietzel et al, 2014) ont toutes

été appliquées à l'observation de l'architecture sanguine. Ces techniques sont abordées dans le cadre de ce travail de synthèse et elles sont accompagnées des considérations nécessaires pour la fabrication de tel système de microscopie.

De plus, les vaisseaux sanguins peuvent être observés par des méthodes d'imagerie moléculaire. Ces méthodes reposent sur l'utilisation d'un agent colorant sanguin qui est réactif à une certaine longueur d'onde de la lumière. L'excitation par la lumière cause la molécule à émettre de la lumière à son tour, mais dans une autre gamme de longueurs d'onde. L'utilisation de filtres spectraux permet ainsi à l'observateur de mettre en évidence la structure contenant ces molécules qui sont, dans ce cas-ci, les vaisseaux sanguins. Il est important de mentionner que la réémission de la lumière par la molécule est la conséquence de la fluorescence (Yutaka Tomita, 2005), la phosphorescence (Pavel S. Chelushkin, 2019) ou d'effets multiphotoniques (David Kleinfeld, 1998).

L'utilisation des techniques d'imagerie intrinsèque et moléculaire nécessite un environnement de travail et des méthodologies chirurgicales permettant d'accéder aux vaisseaux sanguins dans des modèles animaux *in vivo*. Alors, une part importante de ces expérimentations repose sur les techniques de chirurgie employées afin de révéler la surface corticale située sous le crâne. Différentes méthodes sont disponibles aux chercheurs telles que l'effacement osseux par le biais de produits chimiques (Yan-Jie Zhao, 2018), l'amincissement du crâne (Guang Yang, 2010) ou la craniotomie avec installation de hublots corticaux (Anthony Holtmaat, 2009). Chacune de ces techniques chirurgicales vise à diminuer l'impact de la perte de signal par réflexion, absorption et diffusion que l'os induit dans le trajet optique du microscope.

La combinaison des techniques d'imagerie avec des techniques chirurgicales permet d'ouvrir la voie à l'observation *in vivo* des fonctions des tissus cérébraux. Des travaux notables sur le couplage neurovasculaire ont permis de mettre en évidence l'implication microscopique des structures vasculaire dans des modalités d'imagerie mésoscopique (Congping, 2021) ou l'observation des réseaux neuronaux par l'imagerie multiphotonique des ions de calcium dans le cortex (Stosiek, 2003). Ces différentes techniques annexées permettent alors d'observer les fonctions vasculaires dans le cas de certaines neuropathies et d'en déduire les mécanismes sous-jacents.

1.1.2 Les micro-occlusions vasculaires transitoire

Dans le cas de certaines neuropathologies, des modèles animaux permettent de reproduire ce qui est observé dans les neuropathologies humaines. Des modèles incluant les AVC, la maladie d'Alzheimer ou la démence sont tous disponibles pour les chercheurs et sont principalement basées sur des souches génétiques ou des manipulations chirurgicales en laboratoire. Notamment, l'apparition de micro-occlusion transitoire est aussi observée dans ces modèles de pathologie cérébrale murine. La quantification de ces blocages a permis de démontrer une présence accrue de blocages transitoires suivant un accident ischémique (Yuankang Lu, 2020). De plus, dans les modèles murins de maladie d'Alzheimer, il a été démontré que ces micro-occlusions transitoires sont causées par l'adhésion des leucocytes sur la paroi des capillaires sanguins (Hernandez, 2019) produisant ainsi une diminution localisée de l'influx sanguin cérébral (ISC). Les causes pour ces blocages transitoires ne sont pas encore bien définies, mais plusieurs pistes hypothétiques sont privilégiées telles que la présence d'inflammation corticale amincissant le glycocalix endothélial (Yoon, 2020) ou l'apparition de facteurs d'adhésion endothéliale (Hernandez, 2019).

Des modèles techniques plus invasifs ont été aussi développés afin de moduler l'irrigation sanguine dans les capillaires sanguins. En utilisant l'irradiation des capillaires sanguins par un laser à haute puissance pulsée, la création d'hémorragies, d'extravasation et de blocages par caillots de sang a été démontrée (Nishimura, 2006). Cette technique permet de simuler un blocage avec un caillot sanguin suivant un protocole d'exposition au laser et une augmentation du volume sanguin par injection intravénale de saline. Cependant, cette méthode afin de créer des dommages au niveau des capillaires sanguins est peu représentative des modèles neuropathologiques qui exhibent des blocages transitoires. Un modèle se reposant sur la création d'inflammation locale serait plus représentative afin d'exploiter le mécanisme de l'adhésion des leucocytes sur la paroi vasculaire des capillaires sanguins. La photothrombose comme moyen de causer une telle inflammation semble être un candidat de choix afin d'accomplir cette tâche (Labat-Geist, 2013). Cependant, l'utilisation de lumière visible afin d'exciter les agents photothrombotiques limite la certitude des observations. Des phénomènes telles que la dispersion et le parcours optique dans le tissu biologique implique l'excitation de structures vasculaires en périphérie de vaisseaux sanguins visés. Afin de réduire cette zone d'excitation, serait-il possible de tirer avantage d'un effet optique d'excitation confiné spatialement tel que la microscopie multiphotonique?

De plus, malgré les efforts pour étudier les blocages transitoires, peu de littérature se concentre sur les conséquences microscopiques du phénomène. Des simulations de sous-régions vasculaires semblent pointer une diminution de l'irrigation des vaisseaux en périphérie lors d'événements transitoires et une réduction de l'oxygénation dans les tissus corticaux (Hartung, 2021). Cependant, plus d'effort dans le domaine devrait porter sur les fonctions vasculaires d'un point de vue microscopique et la conséquence des blocages transitoires afin d'améliorer les connaissances sur cet aspect des neuropathologies.

1.2 Objectifs de recherche

Avec la présentation des différents concepts introduits dans cette thèse, nous établissons 2 objectifs principaux qui seront abordés sous la forme d'articles scientifiques.

Puisque l'observation des micro-occlusions vasculaires est une tâche complexe nécessitant de longues séances d'imagerie à haut débit, un protocole permettant l'apparition de micro-occlusions doit être mis sur pied. La possibilité de causer des micro-occlusions confinées à un capillaire sanguin permettrait l'étude des conséquences de ce phénomène à bas niveau vasculaire. L'utilisation du mécanisme expliqué par Hernandez pourrait être exploité par le biais de la création d'inflammation locale au sein des capillaires sanguins tout en tirant profit de l'excitation spatiale confinée que procure l'effet multiphotonique.

Objectif 1: Développer une méthodologie permettant le blocage des capillaires sanguins de façon contrôlée et reproductible afin d'offrir une nouvelle avenue pour observer les blocages transitoires et d'en étudier les mécanismes sous-jacents.

Cet objectif a été complété par la démonstration de micro-occlusions sanguines par l'effet multiphotonique de l'agent photothrombotique Rose Bengal. Les résultats de ces expérimentations ont été présentés dans le cadre du séminaire SPIE 2021 sous le titre *Multiphoton excitation of Rose Bengal to induce capillary photo-thrombosis*. Le travail de recherche a été publié dans *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism (JCBFM)*.

L'observation des neutrophiles *in vivo* nécessite de l'étiquetage immunitaire en fluorescence en utilisant une protéine de surface spécifique, le Ly6G. Cette même protéine membranaire est aussi un facteur déterminant dans la capacité d'adhésion des neutrophiles à la paroi vasculaire. Considérant que les micro-occlusions des capillaires sanguins sont causées par l'adhésion des neutrophiles à la paroi vasculaire, l'imagerie par fluorescence des neutrophiles vient influencer la capacité d'observation des micro-occlusions provoquées. Ainsi, l'imagerie intrinsèque n'agissant pas sur la biochimie des neutrophiles est à prioriser afin de permettre des observations conjointes de neutrophiles dans les vaisseaux sanguins.

Objectif 2: Développer un système d'imagerie de pointe permettant d'imager les corps cellulaires et surveiller les vaisseaux sanguins, le tout, sans interférer avec les fonctions vasculaires.

Cet objectif a été complété par la mise en marche d'un système d'imagerie par réflectance confocale à grande longueur d'onde utilisant le contraste de phase afin d'observer de façon intrinsèque les corps cellulaires corticaux et d'effectuer de la cartographie corticale. Les résultats de ces travaux ont été soumis à *Journal of biomedical optics* et seront présentés dans le cadre d'un séminaire à la conférence SPIE 2024.

1.3 Autres contributions

Dans le cadre du parcours aux cycles supérieurs, l'opportunité de collaboration avec mes pairs a permis d'étendre certaines connaissances et aptitudes afin de faire avancer des projets dans différents domaines scientifiques. Allant de l'intelligence artificielle afin de segmenter les vaisseaux sanguins passant par l'imagerie ultrason, la modélisation vasculaire et l'imagerie OCT, certaines contributions venant de travaux antérieurs et de travaux actuels ont permis d'aider des collaborateurs à mener à bien leurs projets. Ces différentes contributions sont listées ci-bas.

Participation à l'écriture et résultant de travaux en optiques.

- Lefebvre, J., Delafontaine-Martel, P., Pouliot, P., Girouard, H., Descoteaux, M., & Lesage, F. (2018). Fully automated dual-resolution serial optical coherence tomography aimed at diffusion MRI validation in whole mouse brains. *Neurophotonics*, 5(4), 045004-045004.
- Lefebvre, J., Delafontaine-Martel, P., & Lesage, F. (2019, June). A review of intrinsic optical imaging serial blockface histology (ICI-SBH) for whole rodent brain imaging. In *Photonics* (Vol. 6, No. 2, p. 66). MDPI.
- Lefebvre, J., Delafontaine-Martel, P., Lemieux, P., Descoteaux, M., Petit, L., & Lesage, F. (2021, March). Localization and imaging of white matter fiber crossings in whole mouse brains using diffusion MRI and serial blockface OCT. In *Optical Techniques in Neurosurgery, Neurophotonics, and Optogenetics* (Vol. 11629, pp. 110-117). SPIE.

Participation par le biais de données provenant de travaux antérieurs et vérification de texte.

- Damseh, Rafat, et al. "Automated Analysis of Brain Microvasculature: From Segmentation to Anatomical Modeling." *2020 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)*. IEEE, 2020.
- Damseh, R., Delafontaine-Martel, P., Pouliot, P., Cheriet, F., & Lesage, F. (2020). Laplacian flow dynamics on geometric graphs for anatomical modeling of cerebrovascular networks. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 40(1), 381-394.
- Belgharbi, H., Porée, J., Damseh, R., Delafontaine-Martel, P., Lesage, F., & Provost, J. (2019). Anatomically realistic simulation framework for ultrasound localization microscopy. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 146(4), 3031-3031.
- Milecki, L., Porée, J., Belgharbi, H., Bourquin, C., Damseh, R., Delafontaine-Martel, P., ... & Provost, J. (2021). A deep learning framework for spatiotemporal ultrasound localization microscopy. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 40(5), 1428-1437.
- H. Belgharbi *et al.*, "An Anatomically Realistic Simulation Framework for 3D Ultrasound Localization Microscopy," in *IEEE Open Journal of Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 3, pp. 1-13, 2023.

Participation en séminaire.

- Delafontaine-Martel P. Rose Bengal multiphotonic process and reflectance confocal microscopy as experimental tools to monitor and perturb capillary-level blood flow. Présentation dans le cadre de l'atelier intitulé « Modélisation vasculaire et métabolique du cerveau à grande échelle » au centre de recherche en mathématique de l'Université de Montréal.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Propriétés optiques des tissus biologiques

Un concept fondamental pour effectuer de l'imagerie sur un tissu biologique est l'interaction entre ce tissu et la lumière utilisée pour l'illumination. La possibilité d'interaction entre la lumière et le tissu est déterminante dans l'application désirée. Par exemple, l'utilisation des rayons X afin d'observer l'atténuation du parcours de la lumière dans un bras pour y diagnostiquer une fracture suppose que la lumière peut traverser l'échantillon et que l'atténuation de ces rayons est dépendante des composants biologiques qu'elle rencontre (tel que les os dans l'exemple mentionné ci-haut). Dans cette section, il sera mis en évidence l'importance et la complexité de quelques interactions lumière-matière permettant de retirer de l'information structurelle ou moléculaire des tissus biologiques dans le cadre d'applications en microscopie. Les différents concepts présentés seront accompagnés de leur lien à l'imagerie corticale puisque ce document de synthèse se concentre sur ce sujet.

2.1.1 Modélisation de la lumière

Afin de bien conceptualiser ce qu'est la lumière, il est présenté la modélisation classique d'une onde électromagnétique ainsi que les différentes propriétés ayant une incidence sur les interactions possibles avec des tissus biologiques. Le modèle classique provenant des équations de Maxwell gouvernant le comportement des ondes électromagnétiques indique qu'il est possible de représenter mathématiquement une onde électromagnétique par la superposition spatiale d'un champ électrique oscillant et une onde magnétique conjointe se déplaçant dans une direction commune. Afin de simplifier, nous considérons une onde plane harmonique avec une description mathématique comme suit :

$$\vec{E}(r, t) = \vec{E}_o e^{-i(\omega t - \vec{k}\vec{r})} \quad (1)$$

$$\vec{B}(r, t) = \vec{B}_o e^{-i(\omega t - \vec{k}\vec{r})} \quad (2)$$

Où le champ électrique E et le champ magnétique B sont définis comme des champs vectoriels complexes ayant une oscillation temporelle d'une fréquence de ω et une oscillation spatiale d'une

valeur du vecteur d'onde k vectoriel pointant dans la direction de propagation de l'onde. Une représentation graphique de ce modèle est fournie à la Fig. 2.1. À ces représentations, il faut ajouter les propriétés primaires telle que la vitesse de la lumière dans le milieu de propagation et l'équation de dispersion respectivement:

$$c = \frac{1}{\sqrt{\mu_0 \epsilon_0}} \quad (3)$$

$$\omega = \frac{c}{n(\omega)} \|\vec{k}\| \quad (4)$$

Où ' c ' est défini comme la vitesse de la lumière dans le vide décrite par ϵ_0 qui est la permittivité électrique du vide et μ_0 qui est la perméabilité magnétique du vide. L'indice de réfraction du milieu est dénoté par n qui représente une déviance dans la vitesse de phase de la lumière provenant d'une permittivité ou perméabilité autre que celles du vide. Puisque les valeurs du vecteur d'onde et de la fréquence temporelle sont tous deux liés à la vitesse de la lumière, l'équation 4 démontre l'implication du changement d'indice de réfraction si cette dernière est dépendante de la fréquence de l'onde. Ainsi, un milieu ayant un indice de réfraction changeant en fonction de la fréquence est appelé dispersif puisqu'il aura tendance à changer la vitesse des ondes électromagnétiques causant une perte de cohésion inter-fréquentielle.

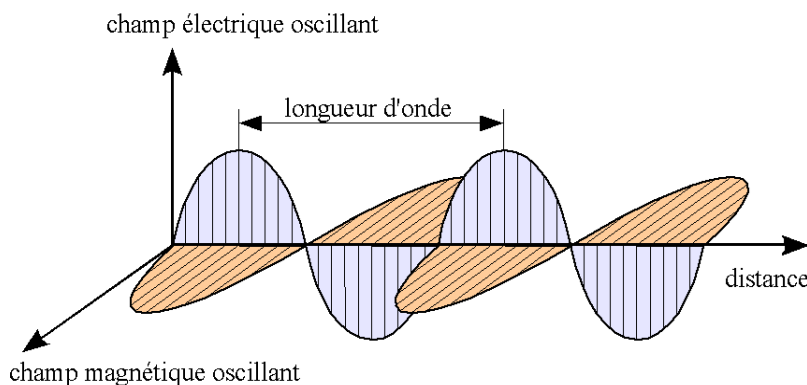


Figure 2.1 : Représentation graphique dans le domaine de valeurs réelles d'une onde électromagnétique figée dans le temps. Puisque la modélisation mathématique démontre une variation temporelle et spatiale, il est important de spécifier qu'une onde électromagnétique est un objet dynamique.

Cette définition mathématique présentée offre aussi comme propriété l'orientation de l'amplitude du champ électrique. Cette propriété nommée la polarisation de l'onde joue un rôle primaire dans la possibilité d'interaction. Il sera discuté plus en profondeur l'interaction de ces champs et l'implication des propriétés mentionnées sur un tissu dans les sections suivantes. Avec cette représentation mathématique classique des ondes électromagnétiques qui représente bien la lumière, la démonstration des différentes interactions avec les tissus peut maintenant être présentée.

L'utilisation de la théorie classique doit être prise comme outil de vulgarisation dans ce document de synthèse, puisque la théorie quantique des ondes permet une meilleure compréhension de certains phénomènes, mais dans un but de condenser les explications et permettre une présentation simplifiée des différents concepts optiques abordés, il ne sera pas présenté aussi profondément les concepts de mécanique quantique.

2.1.2 Les interactions lumière-matière

2.1.2.1 Les équations de Fresnel

Lors de l'illumination d'une cible avec la lumière, il est important de comprendre les équations associées aux interactions des ondes électromagnétiques sur les constituants de la cible. Les premières équations à considérer sont les interactions aux interfaces des milieux optiques et sont principalement décrites par les équations de Fresnel.

Cet ensemble d'équations permet de décrire quelle proportion de la lumière projetée sur une interface sera transmise et quelle proportion sera réfléchie. Si nous considérons une surface lisse ne causant pas de réflexions spéculaires ainsi que des milieux dont la perméabilité magnétique est celle du vide, il est possible de dériver, à partir des conditions frontières électromagnétiques, les coefficients de Fresnel pour la réflexion et la transmission des ondes. Ceux-ci sont représentés par des fractions d'amplitude transmise et réfléchie de l'amplitude incidente. En observant la Fig. 2.2 ci-contre, il y est démontré que les équations de Fresnel pour les cas de polarisation parallèle aux plans d'incidence construits par les vecteurs d'ondes sont décrites par les équations 5 et 6. Pour les cas de polarisations perpendiculaires au plan d'onde, les équations 7 et 8 sont à utiliser (Skaar, 2006).

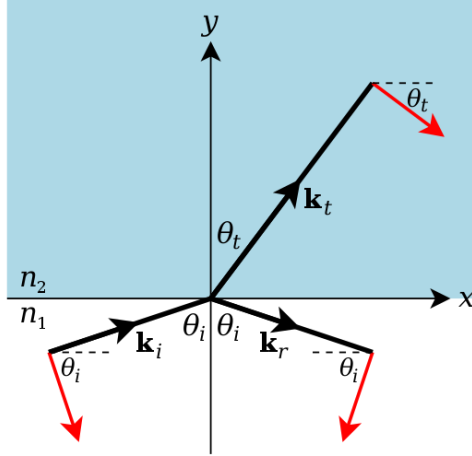


Figure 2.2: Représentation schématique de l'interaction aux interfaces entre deux milieux de propagation d'une onde électromagnétique. Une onde incidente à une interface de milieu de propagation donne lieu à une onde réfléchie et une onde transmise.

$$r_{||} = \frac{n_2 \cos \theta_I - n_1 \cos \theta_T}{n_2 \cos \theta_I + n_1 \cos \theta_T} = \frac{E_{0R||}}{E_{0I||}} \quad (5)$$

$$t_{||} = \frac{2n_1 \cos \theta_I}{n_2 \cos \theta_I + n_1 \cos \theta_T} = \frac{E_{0T||}}{E_{0I||}} \quad (6)$$

$$r_{\perp} = \frac{n_1 \cos \theta_I - n_2 \cos \theta_T}{n_1 \cos \theta_I + n_2 \cos \theta_T} = \frac{E_{0R\perp}}{E_{0I\perp}} \quad (7)$$

$$t_{\perp} = \frac{2n_1 \cos \theta_I}{n_1 \cos \theta_I + n_2 \cos \theta_T} = \frac{E_{0T\perp}}{E_{0I\perp}} \quad (8)$$

Où les indices R, I, || et \perp décrivent la réflexion, la lumière incidente, la polarisation parallèle et la polarisation perpendiculaire respectivement. Les angles et indices de réfractifs sont démontrés dans la figure associée. Ces coefficients de Fresnel présentés démontrent que la polarisation est un facteur jouant sur la réponse d'une onde électromagnétique lors de la rencontre d'une interface. Ainsi, l'utilisation d'une source laser rencontrant une cible à imager fournit une réflexion qui peut être collectée pour fin d'imagerie et une certaine quantité de cette onde est transmise permettant la possibilité d'une rencontre supplémentaire avec une interface plus éloignée dans le trajet optique.

Les tissus biologiques corticaux étant des milieux non-uniformes, la théorie présentée ci-haut est une approximation et vulgarisation des interactions lorsqu'une onde rencontre un changement d'indice de réfraction provenant de membranes cellulaires ou de tissus biologiques différents. En somme, il est possible d'interagir avec les constituants du milieu biologique afin d'en retirer de l'information structurelle.

2.1.2.2 L'atténuation optique dans les milieux

L'absorption de la lumière est un phénomène fondamental qui se produit lorsqu'une substance absorbe sélectivement certaines longueurs d'onde de l'onde électromagnétique incidente. Cet effet peut être observé dans une grande variété de matériaux, tels que les solides, les liquides et les gaz. Lorsqu'une onde traverse un matériau, elle interagit avec les atomes et les molécules constituant ce matériau. Ces entités possèdent des niveaux d'énergie quantifiés et établis par la mécanique quantique. La lumière peut être absorbée par ces différents systèmes lorsque l'énergie d'un niveau est semblable à l'énergie que la lumière contient. L'absorption optique cause une transition électronique ou moléculaire entre différents niveaux d'énergie. Cette énergie sera alors convertie en chaleur ou réémission de lumière, le tout dépendant des probabilités de transition d'état des atomes ou molécules excitées. Ainsi, chaque matériau a un spectre d'absorption caractéristique qui indique les longueurs d'onde spécifiques auxquelles il absorbe l'énergie électromagnétique. Les longueurs d'onde qui ne sont pas absorbées sont généralement transmises ou réfléchies aux interfaces du milieu. Cependant, un effet supplémentaire nommé la diffusion vient interagir avec le parcours de la lumière. Lorsque le milieu n'est pas homogène, les différents constituants vont interférer avec le parcours optique des ondes. Le regroupement des effets liés à l'absorption et à la diffusion va causer l'atténuation de l'illumination dans un tel milieu non homogène.

L'atténuation optique peut être quantifiée par la loi de Beer-Lambert modifiée. Cette loi indique que l'absorbance et la diffusion ont comme conséquence de réduire l'intensité d'une onde lumineuse dans le milieu de propagation. En supposant que la fraction de l'onde absorbée et diffuse par unité de longueur est indépendante de l'intensité, il est possible de retrouver une équation d'atténuation de l'intensité lumineuse allant comme suit :

$$I(x) = I_0 e^{-\mu x} = \frac{cn\epsilon_0}{2} \|E_0\|^2 e^{-\mu x} \quad (9)$$

$$-\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \frac{1}{x} = \mu = \mu_s + \mu_a \quad (10)$$

Où I est l'intensité lumineuse, I_0 est l'intensité initiale étant approximativement le carré de l'amplitude du champ électrique, μ est le coefficient d'atténuation, une constante qui dépend du matériau et de la longueur d'onde de la lumière et x représente la longueur du trajet optique. Dans les tissus biologiques, une partie importante de l'atténuation provient de la diffusion dénotée μ_s . Cette diffusion est causée par les interactions telles que la diffusion Raman ou la diffusion provenant de la théorie de Mie. Ces interactions ont pour conséquences de changer la trajectoire des ondes électromagnétiques dans le milieu de propagation en changeant ou non la longueur d'onde.

Pour des tissus biologiques corticaux, évidemment non homogènes, plusieurs constituants du tissu doivent être analysés indépendamment afin de bien concevoir l'atténuation optique. Cependant, les principaux acteurs agissant dans l'atténuation optique dans les tissus biologiques sont l'eau, le sang, les lipides et la diffusion provenant de la théorie de Mie. Lorsque les effets des différents acteurs sont combinés, il est possible d'observer des zones d'atténuation optique minimales dans certaines gammes du spectre électromagnétique. Ces zones nommées les fenêtres optiques biologiques (NIR) sont combinées en quatre plages spectrales (Golovynskyi, 2018) allant de 700 nm à 1000 nm pour la plage NIR-I, 1000 nm à 1350 nm pour NIR-II, 1550 nm à 1870 nm pour NIR-III et 2100 nm à 2300 nm pour NIR-III. Ces régions sont présentées à la Fig. 2.3 pour l'atténuation optique corticale. Ces différentes plages spectrales connues pour les tissus biologiques peuvent changer dépendamment du tissu étudié. Dans le cas d'observations effectuées sur des tissus tels que la peau, la mélanine, protéine colorant la peau, peut jouer un rôle important dans l'atténuation optique. Ainsi, certaines plages spectrales des fenêtres optiques peuvent aussi s'en retrouver changées (Hao Ou-Yang, 2004).

Plusieurs travaux scientifiques se concentrant sur la possibilité d'utiliser ces différentes plages optiques ont permis de repousser la limite de profondeur d'imagerie corticale. Des applications allant de l'imagerie intrinsèque telle que la microscopie par réflexion confocale (Fei Xia, 2018) ou la microscopie trois photons (Nicolas G. Horton, 2013) ont permis l'imagerie de structures sous-corticales au-delà du millimètre de pénétration optique tel que des vaisseaux sanguins ou la capsule

externe. Ainsi, la possibilité de tirer avantage de plages spectrales ayant une atténuation optique minimale ouvre la possibilité d'observation de fonctions vasculaires *in vivo* profondément dans le tissu cérébral.

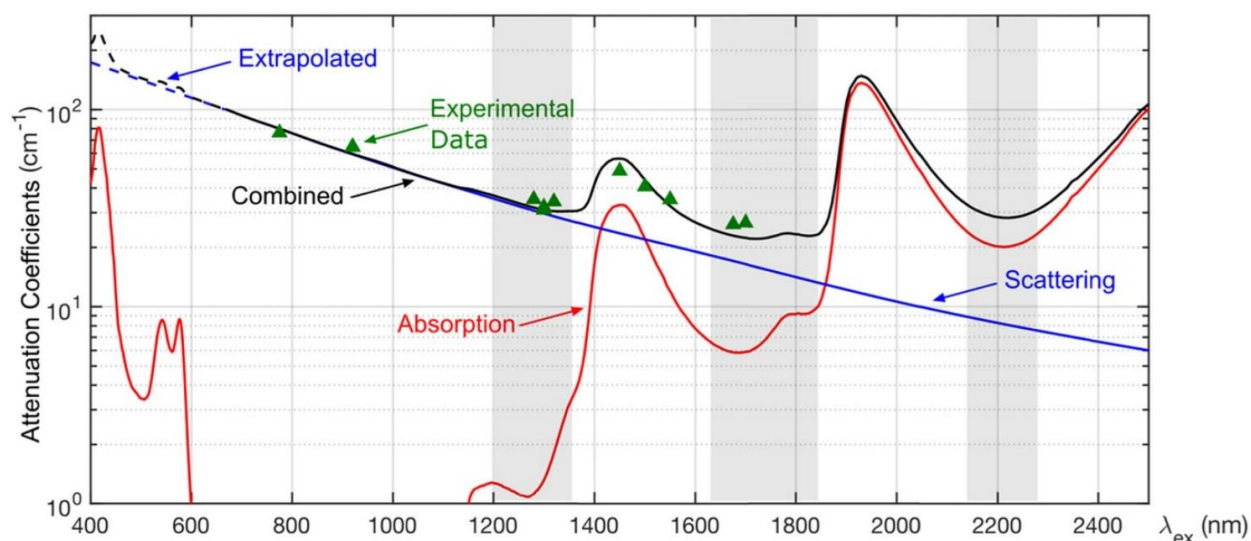


Figure 2.3: Représentation graphique de l'atténuation optique selon la longueur d'onde d'excitation. La sommation de l'absorption des tissus cérébraux (rouge), principalement le sang, l'eau et les lipides, et de la diffusion optique (bleu) est démontré par la courbe en noir qui représente l'atténuation optique. Certaines données expérimentales sont démontrées comme étant en accord avec la théorie. Quatre zones spectrales se démarquent par leur faible atténuation ou absorption. L'image provient de la référence : Sylvain Gigan 2022.

Ainsi, dans les applications en microscopie, il est important de bien sélectionner le domaine spectral afin d'offrir une atténuation optique minimale selon l'épaisseur des tissus étudiés. Par ailleurs, il va de soi que l'utilisation de la fenêtre NIR-II n'est pas nécessairement optimale dans toutes les applications en microscopie, par exemple des applications en histologie. La fixation et la coupe mince des tissus apportent une solution alternative à l'atténuation optique dans les tissus biologiques.

Il est à ajouter que le développement de système d'imagerie dans la gamme spectrale NIR-II est une priorité dans le but d'observer des phénomènes biologiques profondément dans les tissus *in vivo*. C'est pourquoi de grands efforts sont déployés afin d'améliorer la capacité de détection et d'illumination à cette gamme de longueurs d'onde. Conventionnellement, les détecteurs utilisés

sont basés sur la transition de bande du Silicium. Ce matériel offrant une efficacité quantique décente entre 200 nm et 1100 nm permet aussi la détection de photons à longueur d'onde plus élevée par le biais de l'absorption biphotonique. La large bande d'absorption est favorable à un tel style de détection, mais ne permet pas la détection efficace par la bande directe du semi-conducteur dépassé 900 cm^{-1} . Afin de développer la détection dans la gamme NIR-II spectrale, la démonstration de nouveaux semi-conducteurs InGaAs implémentés dans des caméras a permis d'élargir l'efficacité et la rapidité de détection dans la gamme spectrale 1000-1700 nm (Eric O. Potma, 2021). De plus, l'implémentation de compteurs de photons à faible température InGaAs a permis de démontrer une haute efficacité de détection dans la gamme spectrale NIR-II poussant la limite de ce qui avait été accompli avec des nanofils supraconducteurs (Marsili F., 2013). En ce qui a trait aux sources d'illumination, différentes approches de laser continues et pulsées ont été développées afin d'exploiter la pénétration accrue dans les tissus biologiques de la bande spectrale NIR-II. Les diverses méthodes de génération de laser allant de milieu de gain dopé avec des matériaux exotiques, de la création de solitons dans des milieux peu dispersifs jusqu'à l'utilisation d'effet multiphotonique (*four-wave mixing*) ont toutes été étudiées et caractérisées afin d'offrir un large catalogue de sources laser utilisables en imagerie biologique (Kirsch, 2020). Ainsi, l'avènement des détecteurs à faible bruit couplé avec le développement des sources laser dans la gamme NIR-II crée un climat scientifique propice à l'utilisation de cette gamme spectrale dans les applications en imagerie biologique *in vivo*.

2.1.2.3 La fluorescence multiphotonique

Différents effets inusuels de l'interaction lumière-matière peuvent aussi être exploités afin de fournir du contraste aux tissus biologiques. Un de ces effets est l'utilisation d'une source de lumière à haute puissance focalisée sur un volume restreint causant une réémission de la lumière étant un multiple de son énergie initiale. Ces catégories de phénomènes, nommés les effets multiphotoniques, utilisent une propriété intrinsèque de la matière qu'il est possible d'expliquer de façon limitée par la vision classique de l'électromagnétisme, mais qui se définit mieux dans le paradigme de l'électromagnétique quantique. Bien que plusieurs effets multiphotoniques existent et que la liste s'allonge avec le développement de nouvelles techniques photoniques, les effets multiphotoniques les plus utilisés en imagerie biologique sont : la génération d'harmonique, la fluorescence

multiphotonique et l'imagerie Raman stimulée. Dans le cadre de ce travail de synthèse, nous ne toucherons qu'à la fluorescence multiphotonique expliquée par la mécanique quantique afin d'expliquer le phénomène dans un paradigme plus complet.

Afin d'expliquer brièvement la fluorescence conventionnelle, il est important de définir que la lumière détient une dualité onde-corpuscule lui procurant une quantité d'énergie et une quantité de mouvement. Étant donné les interactions entre les champs électromagnétiques et les particules chargées, cette quantité d'énergie (quanta) que l'onde transporte peut se transférer à une molécule par l'excitation des niveaux électroniques ou vibratoires de cette dernière. Cette molécule excitée expérimentera une relaxation structurelle et/ou électronique qui émettra à nouveau une onde électromagnétique de moindre énergie que l'onde première ayant servi à l'excitation de ladite molécule. Cette réémission lumineuse peut être utilisée dans différentes applications d'imagerie moléculaire afin d'étudier les fonctions et structures biologiques lorsque combinée avec d'autres méthodologies telles que l'immunoétiquetage (Kyuseok Im, 2019) ou l'étiquetage rétroviral (Jonathan Elegheert, 2018). Ainsi, la réémission de lumière avec une longueur d'onde accrue (i.e. énergie moindre) peut être capturée à l'aide de caméras ou de tubes photomultiplicateurs lorsque séparée de la lumière d'excitation à l'aide de miroirs dichroïques et de filtres spectraux. La filtration spectrale est une considération importante dans l'imagerie par fluorescence. La majorité des molécules couramment utilisées à cette fin exprime une superposition spectrale au niveau de leur absorption et leur émission. Cette superposition engendre des considérations de placement de coupure spectrale afin de limiter la quantité de lumière provenant de la source et maximiser la lumière capturée par les détecteurs. La Fig. 2.4 montre le spectre de la molécule Isothiocyanate de Fluorescéine couramment utilisée en fluorescence avec la superposition des spectres d'absorption et d'excitation.

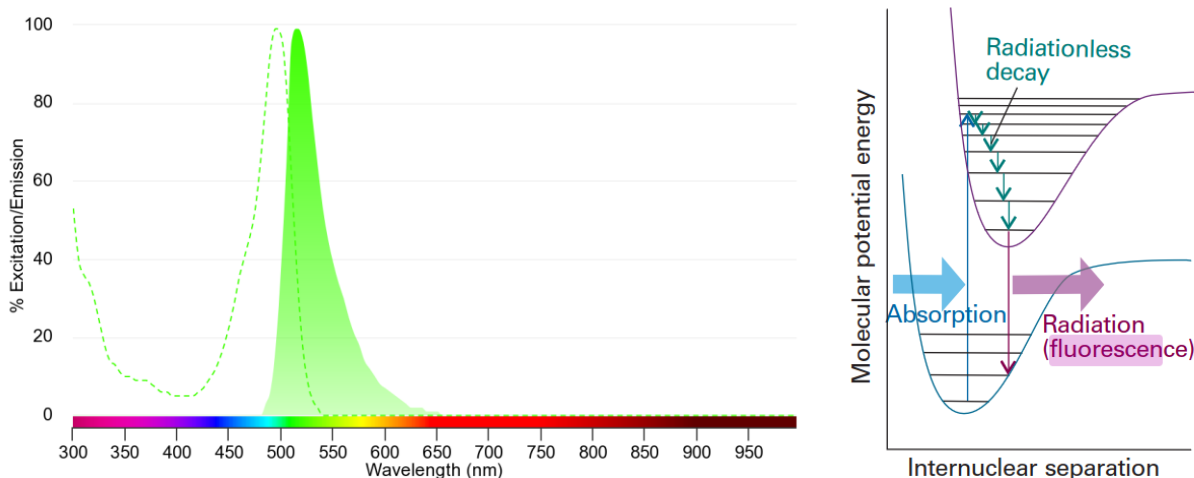


Figure 2.4 : Présentation du mécanisme de la fluorescence. L'image de gauche présente le spectre d'absorption qui est défini par la ligne pointillé verte. Toute lumière dans ce spectre d'absorption est susceptible de produire une réémission de la molécule dans l'étendue spectrale définie par la distribution verte. Il est à noter, que le spectre d'absorption et d'émission de la molécule présentée ci-haut (FitC) présente une superposition spectrale entre l'absorption et l'émission. Ainsi, la source d'excitation et le filtrage spectral doivent être soigneusement choisis afin de limiter la détection de la source et permettre un signal optimal. Cette image est prise de Fluorofinder™. L'image de droite présente le mécanisme d'excitation de la molécule. L'énergie des quantas est définie par les flèches montrant l'absorption (bleu) de la molécule qui monte dans ses niveaux d'énergie comme résultante. La relaxation non-radiative diminue l'énergie de la molécule jusqu'à un niveau d'énergie où la réémission radiative est plus probable. La réémission électromagnétique diminue encore l'état d'énergie de la molécule et libère un quanta d'énergie moindre (mauve) que le quanta d'excitation initial. Cette image provient de *Atkins' physical chemistry*.

Afin de s'affranchir de cette optimisation, il est possible d'utiliser l'excitation multiphotonique. Ce mécanisme s'explique par le même processus d'excitation de la molécule, mais nécessite l'interaction de deux quantas électromagnétiques superposés dans le temps et dans l'espace au niveau du mécanisme d'excitation. Dans ce contexte, la lumière d'excitation est de plus faible énergie que la lumière d'émission. Dans la majorité des cas, aucune superposition spectrale n'est perçue entre la source de lumière d'excitation et la lumière émise par la molécule. La séparation spectrale devient alors triviale et efficace. La Fig. 2.5 démontre le spectre d'absorption de la

molécule FitC avec l'effet deux photons ainsi que le mécanisme avec le diagramme de Jablonski correspondant.

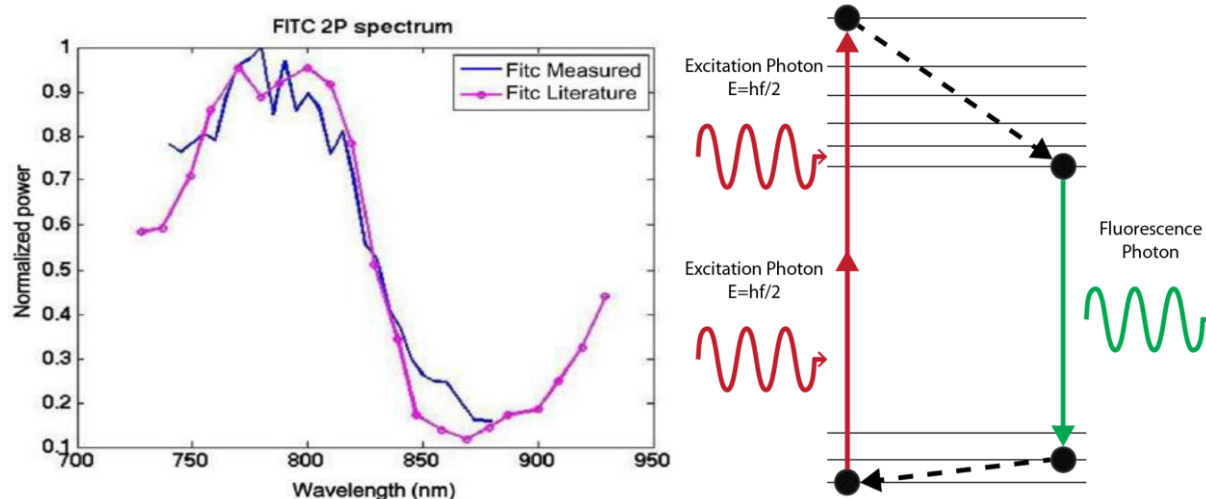


Figure 2.5 : Présentation de la fluorescence multiphotonique. L'image de gauche montre le spectre d'absorption biphotonique de la FitC se trouvant dans une plage spectrale plus basse que la réémission de la molécule. Ainsi, la superposition spectrale s'en retrouve grandement réduite. Cette image provient de Hasani *et al.* L'image de droite montre le diagramme de Jablonski de l'effet biphotonique. L'énergie de deux quantas de lumière s'additionne afin de produire une excitation presque équivalente à un quanta du double de l'énergie initiale. La chaîne de relaxation de la molécule est ensuite semblable à la fluorescence conventionnelle.

Ce style de fluorescence multiphotonique vient avec différents avantages, nécessités et restrictions. L'utilisation de sources proches infrarouge est idéale pour ce type d'imagerie puisque la plupart des molécules fluorescentes réémettent de la lumière dans le spectre visible. De plus, la pénétration optique dans les tissus biologiques est accrue dans le spectre infrarouge, permettant une profondeur d'imagerie augmentée par rapport à la fluorescence conventionnelle. Cependant, une grande puissance optique doit être disponible afin de créer un environnement local propice à l'excitation multiphotonique et assurer une densité de quantas suffisamment élevée afin que deux ou plusieurs de ces quantités d'énergie puisse interagir. Les sources priorisées en neuro-imagerie pour ce type de fluorescence multiphotonique peuvent déployer une puissance optique jusqu'à 2W avec des pulses ayant des fréquences variant de quelques kHz à 100 MHz dans la gamme spectrale du proche infrarouge (650nm – 1100 nm) (Richard KP Benninger, 2013).

2.2 La microscopie par réflectance confocale

Afin d'utiliser les différents concepts d'interactions lumière-matière, l'utilisation de systèmes d'imageries spécialisés est priorisée afin d'optimiser les signaux reçus par le type d'interaction désiré. Un de ces systèmes est la microscopie par réflectance confocale qui sera abordée dans ce travail de synthèse puisqu'il intervient dans la réalisation du second objectif de cette thèse.

2.2.1 Théorie

L'utilisation d'un système optique conventionnel est sujette à quelques limitations. Une d'entre elles, la détection optique du système, ayant une forme conique, capture le signal tout au long du parcours optique laissant des structures floues lorsqu'elles sont situées hors plan. Cette dernière limite grandement la capacité d'avoir des images sans artéfacts de structures hors plan et est susceptible de causer du bruit dans le système d'imagerie. Afin de répondre à ces limitations, une technique d'imagerie fut conçue afin de permettre un sectionnement optique axial : la microscopie confocale. Cette technique se base sur l'utilisation d'une source laser focalisée en un point sur l'échantillon combiné à un parcours optique de détection. Ce dernier étant superposé sur le parcours d'excitation laser. Une schématisation d'un tel montage est présentée à la Fig. 2.6. L'utilisation d'un sténopé est ajoutée dans le parcours de détection afin de couper la lumière hors plan d'imagerie. Cette technique de segmentation spatiale de la lumière collectée et inventée par Martin Minsky en 1950 est utilisée de nos jours dans différentes applications telles que l'imagerie confocale par fluorescence *in vivo* ou, l'immunohistochimie (Zeno Foldes-Papp, 2003), en super-résolution (Bonnie O. Leung, 2011) et l'imagerie par réflectance (Piergiacomo Calzavara-Pinton, 2008). Dans le cas des deux premières applications mentionnées, l'utilisation de filtres spectraux permet la détection de la fluorescence émise par l'échantillon. Tandis que la dernière application utilise un filtrage de la lumière détectée par le biais d'un jeu de polarisation de la lumière. La microscopie confocale a parmi ses principaux avantages d'offrir une résolution axiale et latérale

accrue ainsi qu'un potentiel de sensibilité au signal, lorsque combiné à des détecteurs ayant un niveau de gain élevé et un bruit thermique bas.

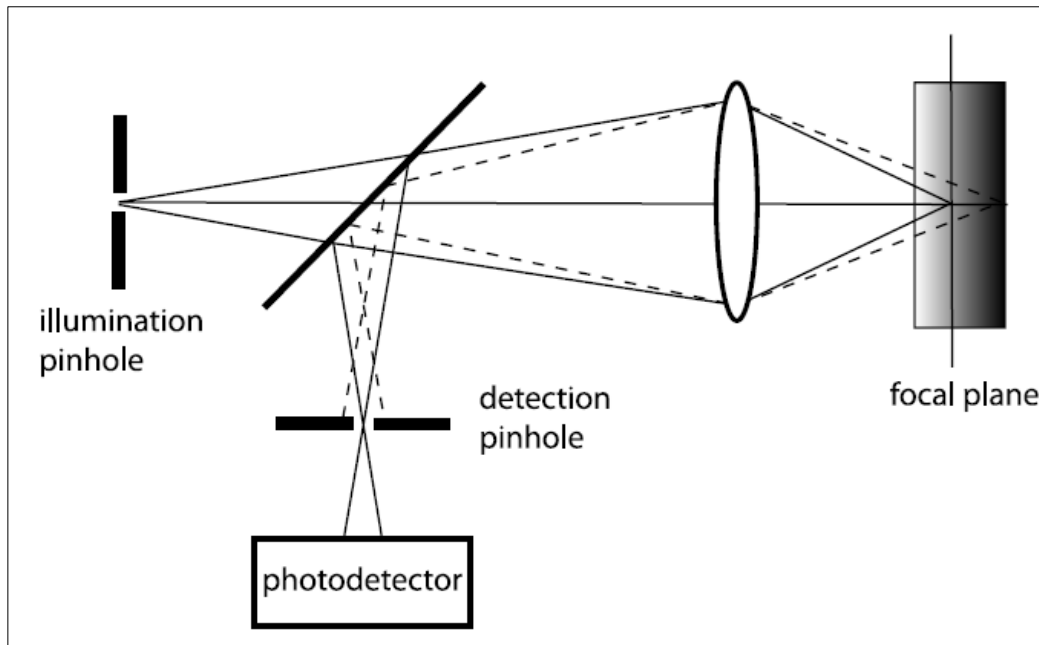


Figure 2.6 : Illustration schématique d'un système confocal. Une source de lumière est focalisée sur l'échantillon. La lumière provenant de l'échantillon (réflexion ou fluorescence) est capturée par le bras de détection qui est annexé à un sténopé. Ce dernier sténopé a pour effet de créer un sectionnement optique en réduisant la quantité de lumière hors plan d'imagerie.

Ainsi, le système de microscopie confocal vient répondre aux limitations précédemment mentionnées en créant une segmentation optique axiale accrue. Afin de mieux définir comment cette segmentation est engendrée, il est nécessaire d'aborder la description mathématique de la résolution axiale et latérale d'un tel système ainsi que différentes considérations de conception.

2.2.2 Résolution axiale et latéral d'un système confocal

La démonstration suivante est inspirée par la référence Tony Wilson, 2011. Afin de bien exprimer la capacité de résolution d'un système confocal, il est important de rappeler que la définition d'une image peut être exprimée par la convolution de la fonction de réponse du microscope sur une distribution de particules réfléchissantes.

$$I(t, w) = \iint f(t_1, w_1) H(t_1 + t, w_1 + w) dt_1 dw_1 \quad (11)$$

$$w = y kn \sin(\alpha) \quad (12)$$

$$t = x kn \sin(\alpha) \quad (13)$$

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (14)$$

Où $f(t, w)$ représente la distribution spatiale des réflecteurs dans les coordonnées optiques latérales w et t . Ces fonctions représentent l'axe verticale et horizontal le long de l'axe optique respectivement. λ correspond à la longueur d'onde d'excitation, α est l'angle d'ouverture numérique et n est l'indice de réfraction du milieu. Ce choix de variable prend en considération les effets de l'ouverture numérique ainsi que celles de la longueur d'onde. H est la fonction de réponse en intensité du microscope. Dans le cas d'un microscope conventionnel, la fonction H est exprimée sous la forme :

$$H_{conv} = |h_{2_eff}(t, w)|^2 \quad (15)$$

Où $h_{2_eff}(t, w)$ est la fonction de réponse en amplitude. Cette fonction est définie en coordonnée circulaire par la définition suivante:

$$|h_{2_eff}(t, w)|^2 = |h_2(t, w)|^2 \otimes D(t, w) \quad (16)$$

$$h(v) = \int P(\rho) J_0(v\rho) \rho d\rho \quad (17)$$

Où $P(\rho)$ représente la fonction de la pupille circulaire sans aberration, J_0 est la fonction de Bessel du premier ordre, D est la fonction marche ('step-function') représentant le diamètre du sténopé et $v = \sqrt{(t^2 + w^2)}$ définissant la distance entre le centre de l'axe optique et le point d'observation. Il est important de noter que la fonction de réponse en intensité H est représentative d'une illumination complète et uniforme de la distribution spatiale des réflecteurs. Dans le cas d'un microscope confocal, si nous désirons trouver la résolution maximale possible, on introduit une fonction de réponse en amplitude d'excitation $h_1(t, w)$ provenant d'un sténopé d'excitation:

$$H_{conf}(t, w) = |h_1(t, w) h_{2_eff}(t, w)|^2 \quad (18)$$

Cette nouvelle définition de H décrit la superposition spatiale de la distribution de l'excitation lumineuse sur la distribution de la détection. Cette superposition crée l'équivalent d'une atténuation d'intensité en bordure de la fonction H_{conf} améliorant la résolution du système. Dans le cas idéal où le sténopé de détection est infiniment petit et que la distribution $h_i(t,w)$ est l'équivalent d'une source ponctuelle, la fonction h_1 et h_2 deviennent identique de par leur sténopé respectif. Ainsi, pour la fonction de réponse en intensité de la microscopie confocale, la forme mathématique devient :

$$H_{conf}(t, w) = \left| h_{2_{eff}}(t, w) \right|^4 \quad (19)$$

Ce nouveau résultat permet de décrire les changements apportés au profil d'intensité pour la microscopie confocale par rapport à la microscopie conventionnelle:

$$u = z 4kn \sin^2(\alpha/2) \quad (20)$$

$$I_{conv}(u, 0) = \left(\frac{\sin(u/4)}{u/4} \right)^2 \quad et \quad I_{conf}(u, 0) = \left(\frac{\sin(u/4)}{u/4} \right)^4 \quad (21)$$

$$I_{conv}(0, v) = \left(2 \frac{J_1(v)}{v} \right)^2 \quad et \quad I_{conf}(0, v) = \left(2 \frac{J_1(v)}{v} \right)^4 \quad (22)$$

Où u représente la variable optique axiale sensible au défocus. Au niveau de chaque fonction d'intensité, il est observé une mise en puissance d'un facteur 2 dans le plan d'imagerie et dans l'axe optique. Ainsi, en définissant la résolution d'un tel système optique comme étant le diamètre du profil d'intensité à la moitié du maximum (*full width half max*, FWHM), il est possible de réécrire les critères de résolution pour la dimension latérale (LFWHM) et la dimension axiale (AFWHM).

$$LFWHM_{conv} = 0.51 \frac{\lambda}{NA} \quad et \quad LFWHM_{conf} = 0.37 \frac{\lambda}{NA} \quad (23)$$

$$AFWHM_{conv} = 0.89 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad et \quad AFWHM_{conf} = 0.64 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad (24)$$

Une analyse rapide des équations démontre un gain de résolution d'un facteur $\sqrt{2}$ provenant de l'effet de restriction spatiale. Cette comparaison mathématique démontre la capacité de l'effet confocal à réduire le profil d'intensité détecté augmentant du même coup la résolution optique du système. Cependant, il est important de prendre en compte que les approximations utilisées dans le cadre de ce développement mathématique n'est pas possible expérimentalement. Une source de lumière ponctuelle ainsi qu'un sténopé de détection infiniment petit (Distribution de Dirac) ne sont pas reproductibles en laboratoire. Ainsi, l'utilisation de critère pour le diamètre du sténopé sont favorisés sous la forme de ratio d'unité de Airy (distance correspondante au diamètre du premier nœud de la fonction de Bessel $J_1(v)$). S'il est pris en compte l'information fréquentielle spatiale qu'il est possible d'obtenir avec différents diamètres de sténopé (voir Fig. 2.7), il est possible d'observer une tendance d'augmentation de l'information fréquentielle au niveau de la fonction de transfert optique (OTF) lors du rétrécissement du sténopé. Il est cependant à noter, qu'expérimentalement, la largeur du sténopé vient aussi couper l'intensité du signal détecté. Ainsi, un travail d'optimisation de la part du chercheur est nécessaire selon l'application voulue du système.

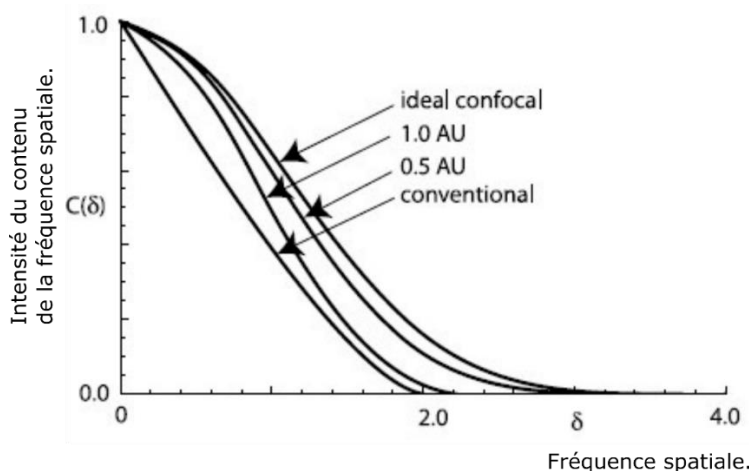


Figure 2.7 : La fonction de transfert optique dépendante du diamètre du sténopé de détection. L'augmentation de résolution provenant de l'effet confocal permet une meilleure sensibilité aux hautes fréquences spatiales d'un échantillon. Ce graphique présente l'intensité fréquentielle spatiale uniformisée (C) en fonction des fréquences spatiales de l'échantillon. Il y est montré que le rétrécissement du sténopé augmente l'intensité dans les hautes fréquences. Cependant, l'intensité lumineuse s'en retrouve réduite, mais ceci n'est pas démontré par le présent graphique. Le cas idéal étant un sténopé infiniment petit. Cette image est prise de Tony Wilson, 2011.

2.3 Méthodes de microscopie supplémentaires

Dans le cadre de cette thèse par article, des techniques de microscopie supplémentaires sont abordées. Que ce soit pour permettre une vérification additionnelle ou une correspondance entre les structures visibles dans les différentes modalités, l'utilisation de la tomographie optique par cohérence optique et la microscopie multiphotonique sont toutes deux des méthodes d'imagerie complémentaires se basant sur le signal intrinsèque des tissus biologique ou la fluorescence multiphotonique respectivement. Deux descriptions sommaires sont présentées dans le cadre de cette thèse afin d'en définir les mécanismes d'imagerie ainsi que leur utilité.

2.3.1 La tomographie par cohérence optique

Afin d'introduire de façon concise la tomographie par cohérence optique ou OCT, il est possible de visualiser cette technique optique comme étant une technique analogue à l'imagerie par ultrason. Cette dernière technique clinique d'imagerie utilise une source sonore émettant une onde mécanique dans le tissu biologique et des transducteurs détectent le signal avec un délai permettant la localisation des constituants ayant réfléchis l'onde mécanique. La méthode OCT est similaire. Cependant, au lieu de l'utilisation d'un délai temporel pour localiser les constituants internes au tissu biologique, l'utilisation de l'interférence optique est mise à profit du système d'imagerie. Se basant principalement sur le fonctionnement d'un interféromètre de Michelson-Morley, une source laser peu cohérente est séparée en deux trajets optiques. Une de ces trajectoires optiques se dirige dans le tissu biologique et le second sur une surface réfléchissante appelée la surface de référence. Avec cette configuration, les constituants internes au tissu biologique remplissent le rôle de second ``miroir``. Ainsi, un balayage spatial du miroir de référence cause des interférences localisées aux distances correspondantes des réflecteurs internes du tissu biologique. L'enregistrement de ces positions permet la reconstitution en profondeur des constituants réfléchissants. Cette méthode d'imagerie intrinsèque ne repose que sur la réflexion des particules internes de l'échantillon créant une origine de signal peu spécifique quant à la nature de ces dits constituants (A. Gh. Podoleanu, 2012). La Fig. 2.8 est une démonstration schématique de cette méthode de balayage causant de l'interférence.

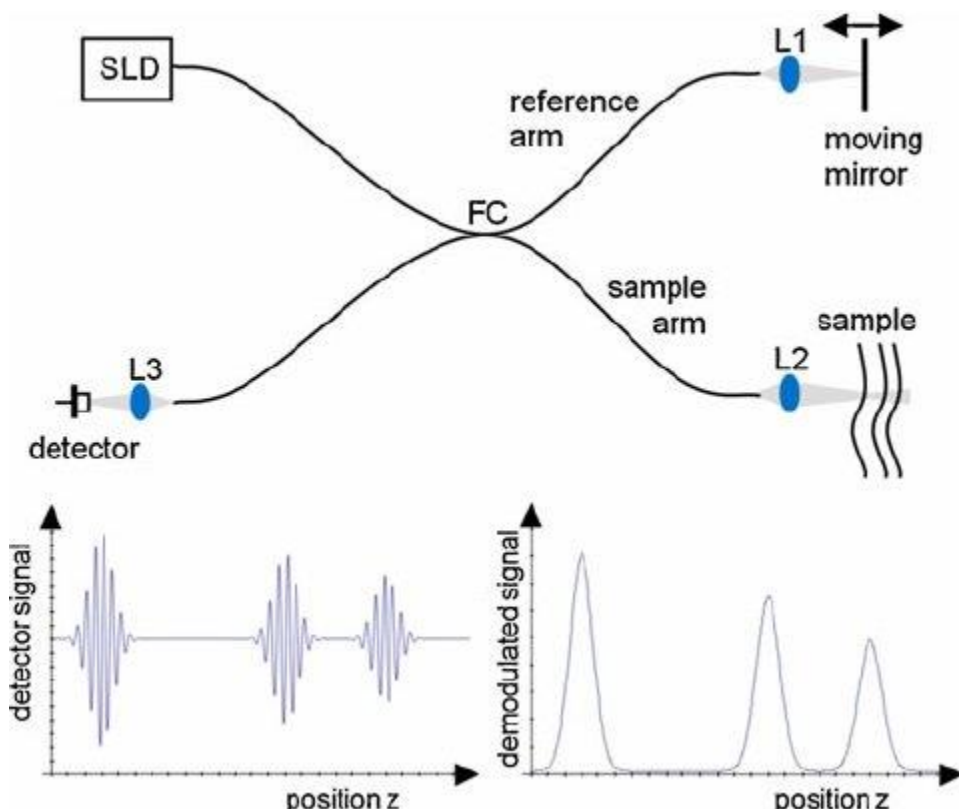


Figure 2.8 : Principe de base de la tomographie par cohérence optique. Une représentation d'un système d'optique passant par des fibres optiques démontre une acquisition type. Une source à faible cohérence est séparée par un coupleur de fibre et recombinaée au détecteur. Un balayage spatial du miroir de référence représenté par les flèches est effectué. Un signal d'interférence est perceptible lorsque la lumière réfléchiée sur le miroir de référence est à une distance optique équivalente d'un élément réfléchissant dans l'échantillon. Cette interférence est démodulée pour retirer l'enveloppe des signaux d'interférence et ainsi construire le signal OCT. Image provenant de Julia Walther, 2011.

La méthode de balayage spatiale du miroir de référence est une méthode peu utilisée aujourd'hui quant à la mise en marche de ces systèmes puisque le déplacement du miroir de référence est peu stable et difficilement implémentable dans le but de faire un système d'imagerie rapide (A. Gh. Podoleanu, 2012). Alors, quant à la méthode de détection, l'utilisation de spectromètre est priorisée afin d'encoder les constituants réflecteurs dans le spectre de l'interférence entre le miroir référence et la lumière réfléchiée par l'échantillon. Cette interférence spectrale peut être isolée par le biais de la soustraction du spectre initial de la source suivie de la transformée de Fourier. Cette méthode

permet de reconstruire les structures réfléchissantes dans le tissu. Cette technique de transformation de Fourier est communément appelée l'OCT spectrale et est implémentable dans le cadre d'imagerie biologique rapide. Cette technique de microscopie ouvrant la voie à de l'imagerie en profondeur optique a été utilisée dans plusieurs applications de recherches et clinique dans des domaines comme l'oncologie, l'ophtalmologie, l'imagerie corticale et l'imagerie sérielle (Adolf F Fercher, 2003).

Parmi les différentes applications de l'OCT, l'utilisation du signal intrinsèque des tissus biologiques dans le but d'en apercevoir des structures à signal dynamique est sans doute la plus utile dans le domaine de l'imagerie vasculaire. Dans le cadre de cette application, la source laser est balayé sur l'échantillon (dans ce cas-ci, un tissu in-vivo avec des vaisseaux sanguins) répétitivement dans une zone d'intérêt afin d'en déceler les structures réfléchissantes dynamiques. Sachant que les vaisseaux sanguins sont des structures exhibant un signal dynamique rapide étant causée par le déplacement des érythrocytes au sein de leur lumen, l'isolation numérique de ces structures peut être faite par le biais d'un filtre temporel. L'implémentation d'un calcul de variance temporelle de l'image divisée par la moyenne temporelle des images permet de révéler une cartographie des vaisseaux sanguins (Richard F Spaide, 2018).

Cette cartographie sanguine est cependant sujette aux différentes limitations de l'OCT spectral. Par la nature de sa reconstitution d'images, la considération du spectre de la source d'illumination est primordiale, puisqu'elle encode les fréquences spatiales des réflecteurs intra tissulaires dans le spectre électromagnétique. Ainsi, la largeur de ce spectre est équivalente à la plage de fréquences sondées dans le tissu permettant de reproduire la carte des réflecteurs intra tissulaires. Alors, dans la majorité des applications, l'utilisation d'une source laser à 1310 nm ayant une large bande spectrale est priorisé afin d'assurer une bonne pénétration de la lumière dans les tissus biologiques (fenêtre biologique NIR-I) et une large bande afin d'encoder les réflecteurs (A. Gh. Podoleanu, 2012). Cette relation complexe entre la largeur de bande spectrale de la source et la reconstruction tissulaire implique que la résolution axiale d'un système microscopique est reliée à la longueur d'onde centrale ainsi qu'à la largeur de bande. Cette relation peut être écrite comme suit:

$$\Delta z = \frac{2 \ln(2)}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \quad (25)$$

Où λ_0 correspond à la longueur d'onde centrale du spectre de la source OCT et $\Delta\lambda$ correspond à la largeur de bande spectrale. La résolution latérale d'un OCT est donnée par l'objectif du microscope provenant de la définition du diamètre de Airy:

$$d_{Airy} = \frac{1.22\lambda_0}{NA} \quad (26)$$

Cependant, il est à noter que les données acquises en dehors de la longueur axiale de Rayleigh exhibent une intensité proportionnelle à leur éloignement du plan d'imagerie. Ainsi, les structures hors plan, malgré qu'elles réfléchissent peu de signal, vont néanmoins influencer la forme de l'interférogramme spectral. C'est pourquoi l'OCT spectrale est utilisée avec des objectifs de microscopie à faible ouverture numérique ou la méthode d'imagerie sera implémentée avec un sous remplissage de la face arrière de l'objectif de microscopie. Ces mesures assurent une longueur de Rayleigh accrue permettant de tirer profit au maximum de la résolution axiale constante selon l'optique du système (Ki Hean Kim, 2008).

Il est à noter que, malgré l'avantage que procure une résolution axiale constante, des objectifs à grande ouverture numérique peuvent aussi être utilisés en remplissant la face arrière de l'objectif et ainsi permettre une technique d'imagerie annexe appelée la microscopie à cohérence optique ou l'OCM. Cette dernière technique veut tirer avantage de la capacité d'acquisition en image d'une tranche épaisse du tissu, une résolution latérale accrue et recombinaison le tout dans une méthodologie d'imagerie sérielle afin de reconstruire numériquement le tissu dans son ensemble (Joseph A. Izatt, 1994).

2.3.2 La microscopie deux photons

Une méthode d'imagerie supplémentaire utilisée dans le cadre de cette thèse est la microscopie par fluorescence multiphotonique. Afin d'expliquer le fonctionnement de la méthode, je demanderais au lecteur de se référer à la section 2.1.2.3 expliquant le mécanisme de la fluorescence multiphotonique. Cependant, quelques considérations supplémentaires sont à prendre en compte lors de la mise en marche d'un tel système. La mise en marche de ce type de système d'imagerie

nécessite 4 composantes principales : La source laser à haute puissance, l'ouverture numérique du système, des filtres spectraux et la détection (voir Fig. 2.9).

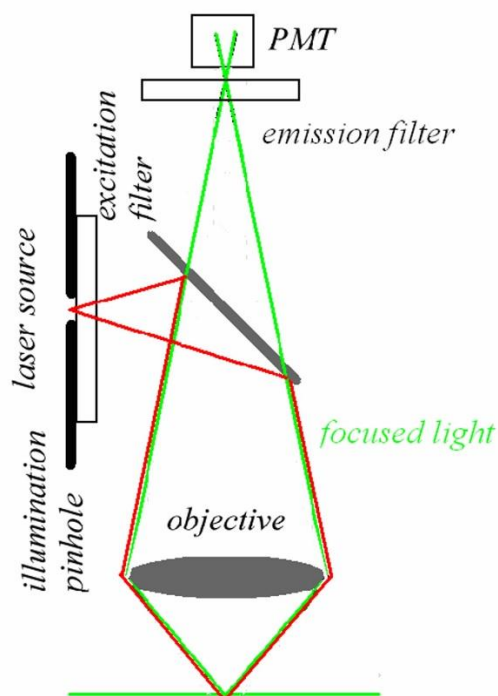


Figure 2.9 : Schéma simple d'un montage deux photons. Une source laser est déviée par un miroir dichroïque et focalisée sur un échantillon par le biais d'un objectif de microscopie. L'effet multiphotonique de fluorescence émet de la lumière dans toutes les directions. Ainsi, une partie de la fluorescence est captée par l'objectif de microscopie, transmise par le dichroïque et renvoyée vers le détecteur. De la séparation spectrale peut toujours être effectuée au niveau de la détection et de l'excitation par le biais de filtres optiques. Image provenant de Alberto Diaspro 2006.

La source laser à haute puissance est une partie cruciale d'un système multiphotonique puisque la longueur d'onde d'excitation ainsi que la densité photonique (puissance laser) sont deux facteurs agissant sur la possibilité d'excitation moléculaire. La longueur d'onde du laser sélectionne la transition électronique moléculaire par le biais des restrictions de transition de moments orbitaux des niveaux d'excitation (Richard KP Benninger, 2013). Il est à noter, que bien que les effets multiphotoniques permettant des transitions équivalentes à une transition ordinaire, la transition multiphotonique n'est pas aussi efficace selon les sondes moléculaires utilisées (Chris Xu, 1996). D'autre part, la puissance laser assure une densité photonique suffisamment élevée afin d'augmenter la probabilité de chance d'interaction photon-photon-molécule. Par exemple, il a été

démontré que l'intensité de l'effet deux photons suit une relation quadratique avec la puissance d'excitation avec la relation suivante (Winfried Denk, 1990).

$$n_a \approx \frac{p_o^2 \delta}{\tau_p f_p^2} \left(\frac{A^2}{2hc\lambda} \right)^2 \quad (27)$$

Où n_a est le nombre de photons absorbés par pulse laser dépendant de la puissance laser P_o , la section efficace δ , la durée du pulse τ_p , la fréquence de répétition f_p , l'ouverture numérique du système A , la constante de Planck h , la vitesse de la lumière c et la longueur d'onde λ . Ainsi, la majorité des lasers utilisés afin d'effectuer de l'imagerie multiphoton ont comme caractéristiques de permettre une modulation de leur longueur d'onde afin de sélectionner et d'optimiser l'excitation moléculaire et une haute puissance laser.

Comme l'équation 27 le démontre, l'ouverture numérique est un facteur jouant sur l'efficacité de l'effet multiphotonique à deux photons. Ainsi, la majorité des conceptions de microscopes multiphotoniques utilisent des objectifs de microscopie à grande ouverture numérique et de large ouverture postérieure de l'objectif. Cette disposition permet d'optimiser la taille minimale du faisceau laser au plan d'imagerie puisque cette dernière répond à l'équation de propagation de la lumière focalisée comme l'équation 26 le démontre. Ainsi, une grande ouverture numérique implique une focalisation de la lumière accrue concentrant les photons spatialement et ainsi augmente la densité photonique spatiale au plan d'imagerie.

Pour ce qui est des filtres spectraux, ils ont pour fonctions de couper la lumière d'excitation provenant du laser afin d'éviter de surexposer les détecteurs ainsi que de permettre la transmission optimale de la lumière émise par les molécules fluorescentes. Dans le cas de la microscopie multiphotonique, l'espacement spectral accru entre la source infra-rouge et la lumière capturée comparativement à la fluorescence conventionnelle permet de choisir des filtres spectraux dans une grande gamme de choix. Ces filtres spectraux peuvent exprimer différents filtrages optiques tels que la filtration passe-haut, passe-bas ou passe-bande (Christie K. Madsen, 1999). Certains filtres passe-haut et passe-bas sont appelés aussi miroirs dichroïques lorsqu'ils sont optimisés pour la réflexion. Ils agissent comme des miroirs dans une gamme de longueur d'onde et comme un milieu de propagation pour le reste du spectre électromagnétique. Il est cependant à noter que l'utilisation

de ces miroirs dichroïques dans les applications de microscopie multiphotonique nécessite qu'ils soient conçus pour effectuer leurs fonctions lorsque la lumière incidente traverse ces composantes à un angle de 45 degrés. Cette nécessité provient de la méthode de la collection de la lumière qui est la méthode de l'épi détection, impliquant que la lumière émise par l'effet de fluorescence est collectée aussi par l'objectif de microscopie. L'installation d'un miroir dichroïque derrière la face arrière de l'objectif de microscopie permet de scinder les longueurs d'onde et ainsi envoyé la lumière de la fluorescence dans un bras de détection.

En ce qui a trait à la dernière partie du système d'imagerie, la détection permet la capture de la lumière par le biais de l'effet photoélectrique. Puisque l'effet multiphoton est un phénomène émettant peu de lumière, l'utilisation de tubes photomultiplicateurs en guise de détection pour offrir un gain électrique est priorisé. L'avalanche d'électron résultant de la structure du tube photomultiplicateur est détectée sous la forme d'un signal électrique qui sera interprété par une carte d'acquisition afin de reproduire l'image de l'échantillon. En tout, un tel système contenant ces composantes à la possibilité de capturer l'effet de fluorescence avec un ratio signal sur bruit élevé et une résolution accrue comparativement à la microscopie par fluorescence conventionnelle.

Ces différents avantages de ce type de système d'imagerie ont été mis à contribution de l'étude des fonctions vasculaires dans plusieurs applications. Dans le cas d'observation de développements de maladie neuropathique, il est reconnu qu'un facteur important à considérer est le changement des fonctions vasculaires lors du développement des symptômes (J.C. De La Torre, 2004). Ainsi, des études combinant imagerie sérielle (ex-vivo) et imagerie multiphotoniques sur le développement d'architecture sanguines a permis de mettre en lumière la complexité et les changements durant le développement des symptômes dans des modèles neuropathiques chez la souris révélant des changements locaux dans la densité vasculaire de sous-région corticale (Patrick D-Martel, 2018). Ces tomographies cervicales peuvent aussi être utilisées pour différentes structures biologiques comme la localisation de neurones étiquetés par une méthode rétrovirale (Daniel Barson, 2020) ou afin d'étudier les fonctions de la barrière hématoencéphalique (Tam Nhan, 2013). L'imagerie multiphotonique peut aussi s'approprier à l'imagerie in-vivo par le biais d'injections vasculaires de colorant fluorescent. En utilisant un hublot cortical, l'imagerie des vaisseaux sanguins peut aussi être effectué afin d'observer les fonctions vasculaires dans différentes situations telles que la

réponse à l'inflammation (Byun, 2022), la régénération post photothrombose (Sigler, 2010), ou durant des arrêts transitoires de capillaires sanguins (Santisakultarm, 2014).

2.4 La photothrombose

Un des concepts fondamentaux de ce travail de synthèse est la capacité de perturber les fonctions des vaisseaux sanguins. Plusieurs approches méthodologiques existent afin de causer des irrégularités au niveau de la circulation sanguine. Des méthodes chirurgicales telle que restreindre la compliance des carotides par le biais de filaments ou d'anneaux (Yorito Hattori, 2016) ou la rigidification de la carotide par l'application chlorure de calcium (Nataliya Sadekova, 2013) permettent de modifier la pression artérielle dans les vaisseaux sanguins en aval. Ces méthodologies, ayant pour but de reproduire les observations faites dans des sujets hypertensifs ont permis plusieurs observations tel qu'une réduction marquée du débit sanguin, l'apparition de lésions et de raréfaction de la matière blanche et dans le cortex (Kazuo Washida, 2019), augmentation de la pulsatilité sanguine et neurodégénérescence (Nataliya Sadekova, 2013).

Cependant, d'autres méthodes permettent d'impacter le système vasculaire de manière plus directe sans manipulations chirurgicales au niveau des vaisseaux sanguins. Une méthode proposée par William I. Rosenblum et Farouk El-Sabban en 1977 et démontrée chez le rat en 1985 par Brant D. Watson a gagné en popularité et se fit nommer la méthode photothrombotique (Vivien Labat-Geist, 2013). Cette méthode permet le blocage de vaisseaux sanguins par le biais d'illumination laser avec l'aide d'un agent photothrombotique, molécule spécifique, pré-injectée dans le système sanguin. Cette méthode offre une simplicité chirurgicale et un nombre réduit de manipulations faites sur la souris tout en permettant de bloquer des vaisseaux sanguins de façon minimalement invasive.

2.4.1 Principes d'activation

L'idée principale de la méthode repose sur la photo-activation de molécules sensibles à la lumière qui, une fois préalablement injectées dans le système sanguin, causent une lésion vasculaire. En utilisant une source laser avec une longueur d'onde appropriée, l'excitation de la molécule transfère l'énergie absorbée aux molécules de dioxygène présentes dans le plasma sanguin et se conclut avec la séparation des molécules de dioxygène. Cette séparation donne présence à des radicaux libres d'oxygène qui interagissent avec les parois cellulaires endothéliales entraînant une peroxydation. Cette dernière entraîne un recrutement de plaquettes sanguines qui adhèrent à la paroi vasculaire

et aux cellules rouges présentes dans le plasma sanguin se concluant par une agglomération d'érythrocytes. Cette formation devient alors un thrombus local lorsqu'il se loge dans les vaisseaux sanguins bloquant le débit sanguin en aval. Une illustration de la méthodologie et du phénomène est présentée à la Fig. 2.10.

Différentes molécules peuvent être utilisées afin de produire l'effet photothrombotique. Dans le papier original de Rosenblum et El-Sabban (William I Rosenblum, 1977) du sodium de fluorescéine a été utilisé comme agent chimique photosensible afin de créer ce qui est appelé la cascade d'événements lié à la photothrombose. Des efforts d'expérimentation sont faits avec l'Indocyanide Green (Hye-Min Kng, 2015), l'érythrocyne B et le Rose bengal (Anatholy B. Uzdensky, 2018) qui sont quelques molécules capables de produire des radicaux libres. Le plus populaire dans la littérature, le Rose Bengal, est la molécule la plus utilisée pour des expérimentations corticales. Sa méthode d'injection intrapéritonéale en fait une molécule facile d'utilisation simplifiant les protocoles lors de travaux de recherche complexes.

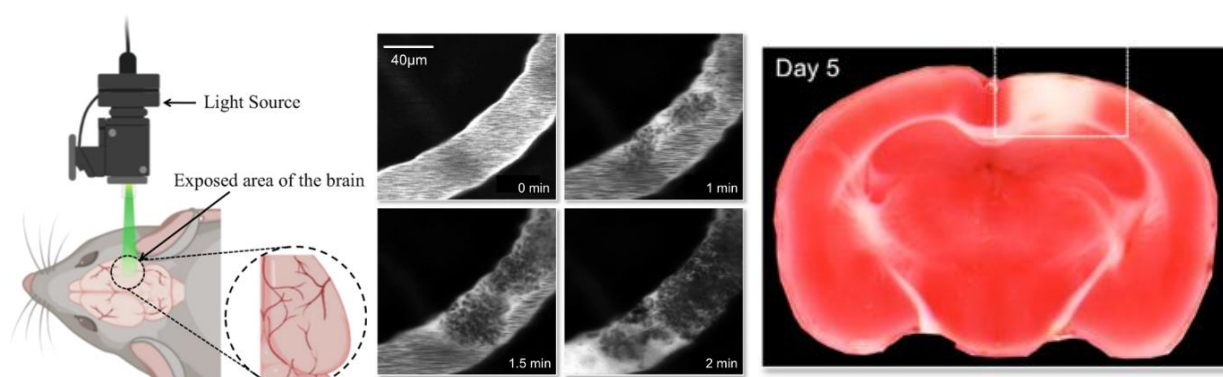


Figure 2.10 : Illustration démontrant le protocole de photothrombose et le blocage résultant de l'excitation optique de l'agent photothrombotique dans le sang. L'exposition à la lumière sur une partie accessible du cortex de la souris se conclut en une région corticale démontrant des signes de lésions photothrombotiques. Les vaisseaux sanguins illuminés démontrent des signes clairs d'agglomérations des cellules rouge causant un thrombus. Les vaisseaux ciblés ne peuvent plus fournir de nutriments au tissu environnant et une lésion caractérisée par de la nécrose est observable suivant le protocole. L'illustration de gauche provient de la référence : Ankit Verma, 2012. Les images suivantes proviennent de Lora Talley Watts, 2015.

2.4.2 Utilisations scientifiques et limitations

Ce processus de création de radicaux libres dans le but d'effectuer des blocages sanguins a été largement utilisé et est très prévisible sur la portée des tissus biologiques touchés. Les différentes utilisations de cette technique comprennent l'observation des mécanismes de protection cérébrale face aux radicaux libres, la réponse cellulaire corticale *in vivo* et l'impact de zones ischémiques sur la survivabilité des cellules atteintes (Anatholy B. Uzdensky, 2018). Une différence marquée du modèle est qu'il cause des blocages sanguins dans les zones illuminées ce qui n'implique pas nécessairement des ruptures de l'endothélium comme observé dans les cas d'AVC cliniques. Cette différence implique une absence de ce qui est appelé la pénombre ischémique dans le modèle photothrombotique. Afin d'y répondre, un modèle d'illumination en cercle peut être utilisé afin de reproduire un centre ischémique au centre de la zone illuminée, ce qui semble causer les mêmes marqueurs cellulaires observés en AVC clinique (Per Wester, 1995).

Malgré ces différences méthodologiques causant des réponses cellulaires différentes, les protocoles d'expérimentation ont cependant une technique d'initialisation du processus de photothrombose qui est relativement cohérente. Dans le cas du protocole avec utilisation du Rose Bengal par exemple, une source de longueur d'onde proche du 562 nm, maximum du spectre d'absorption du Rose bengal, est utilisée afin d'illuminer les vaisseaux sanguins contenant du Rose bengal dans leur lumen. Tel que discuté précédemment, le spectre de la lumière visible dans les tissus biologiques corticaux est hautement susceptible à de la diffusion tel que prédit par la théorie de diffusion de Mie et la diffusion de Rayleigh. Ainsi, la possibilité de réduire la zone atteinte par le processus de la photothrombose est limitée. Par exemple, s'il est désiré de réduire la zone atteinte latéralement dans le tissu (i.e. focaliser la lumière en un point ou sur une structure vasculaire précise), l'utilisation d'un objectif de microscopie serait préconisée. Cependant, la focalisation de la lumière verte dans le tissu implique un profil d'illumination de forme conique dans la direction axiale. Cette illumination hors du plan d'imagerie du système d'excitation implique la création de radicaux libres non désirés dans les vaisseaux voisins aux structures ciblées. Afin de pallier cette excitation non désirée hors du plan d'imagerie, des tentatives se reposant sur des systèmes d'excitation avec une haute ouverture numérique ont été tentés, mais ne peuvent pas empêcher entièrement de l'excitation hors plan de l'agent photothrombotique (Albrecht Sigler, 2008). Une démonstration illustrée est présentée à la figure 2.11.

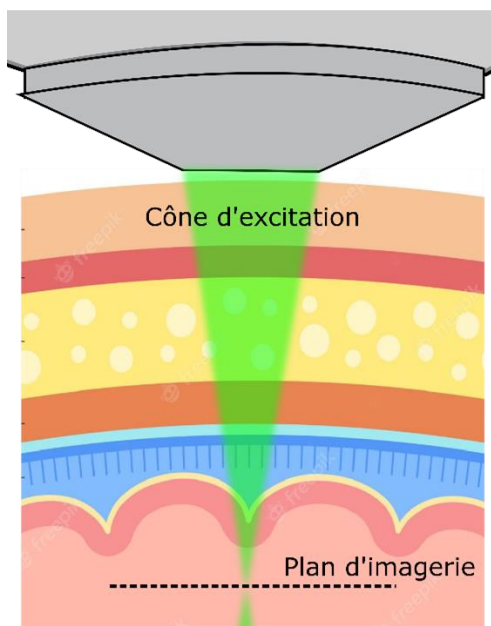


Figure 2.11 : Illustration montrant l'excitation hors plan d'imagerie causée par le trajet optique de la source. Le cône d'excitation illumine les tissus biologiques au-dessus et au-dessous du plan d'imagerie. Pour cette raison, l'effet photothrombotique ciblé sur une structure vasculaire unique (i.e. capillaire sanguin) n'est pas complètement possible avec cette méthodologie.

En somme, l'utilisation d'un agent photothrombotique créant du dommage chimique par l'intermédiaire de la création de radicaux libres dans les tissus vasculaires est une méthode fiable se reposant sur la capacité de délivrer de la lumière d'excitation afin de causer un blocage de vaisseaux sanguins. Cette méthode reproductible doit cependant passer par des manipulations chirurgicales afin de révéler la surface corticale. Elle est aussi sujette à un manque de précision et de confinement spatial en ce qui a trait à la possibilité de cibler qu'un seul vaisseau sanguin.

2.5 Les blocages vasculaires transitoires

Dans le cadre de cette thèse, nous étudierons le concept de blocages vasculaires par la photothrombose. Cependant, ce modèle cherche à reproduire les observations faites dans les neuropathologies ou les maladies vasculaires. Afin de bien comprendre ce qui est cherché à reproduire, une brève revue de littérature est faite sur le sujet des blocages vasculaires et ce qui est observé dans certaines neuropathologies.

2.5.1 Fonctions vasculaires

Le cerveau est un organe complexe et unique n'ayant pas de réserve énergétique. Afin de continuer à effectuer ses fonctions, cet organe nécessite un débit sanguin constant pour réguler les capacités cognitives et conserver l'état d'homéostasie. Le débit sanguin cérébral est constamment régulé afin de fournir aux différentes régions une pression sanguine uniforme ainsi que de permettre une livraison efficace des nutriments aux sous-régions actives. Ce réseau cérébral est constitué de vaisseaux sanguins de différentes tailles comprenant les artères, les artérioles, les capillaires sanguins, les veinules et les veines. Ces différentes structures sont d'une importance capitale quant à la régulation vasculaire et sont étudiées dans les dernières années au niveau de leurs impacts respectifs dans certaines maladies neurodégénératives (Costantino Iadecola, 2017).

2.5.2 Observations et mécanismes

Dans les cas cliniques de la maladie d'Alzheimer et de démence, il est observé une réduction du débit sanguin cérébral. Cependant, le rôle de cette observation dans les débuts de la maladie ou la progression de la maladie n'est pas entièrement connu. Dans les cas de démence, il est cru que des conditions hypoxiques ou ischémiques sont initiatrices de la maladie tandis que dans les cas de la maladie l'Alzheimer, les changements vasculaires sont un symptôme de la neurodégénérescence (Rius-Pérez, 2018). Une corrélation entre ces différentes maladies provient des facteurs de risques communs tels que l'hypertension, le diabète et le vieillissement (Luigi Yuri Di Marco, 2015). Dans un travail de recherche se concentrant sur une cohorte majoritairement atteinte de la maladie d'Alzheimer génétique, la quantification de l'hypersignal T2 en imagerie par résonance magnétique démontre une apparition de dommages potentiels des microvaisseaux jusqu'à sept ans avant l'apparition des symptômes de perte cognitive (Seonjoo Lee, 2016). Cette mesure quantitative suggère un rôle initiateur de la part du système sanguin sur la dégénérescence neuronale plutôt qu'une réduction du débit sanguin comme étant un symptôme. De plus, des initiatives d'imagerie neuronale se concentrant sur des cohortes exprimant la maladie d'Alzheimer ont démontrés que la diminution de flux sanguin cortical précède aussi l'observation des marqueurs tels que les agrégats de protéine tau ou l'accumulation de protéine Amyloïde Béta (Yasser Iturria-Medina, 2016), mais la diminution du flux sanguin cérébral n'est pas retenue comme étant le phénomène initiateur de la maladie.

Ainsi, il est indéniable qu'un mécanisme sous-jacent affectant le système vasculaire est présent dans le développement de la maladie d'Alzheimer, la démence et la perte cognitive vasculaire. Une

des observations contribuant à la diminution de l'influx sanguin cortical est l'apparition de mAVC qui sont présents dans plusieurs maladies et neuropathologies telles que l'anémie à hématie falciforme (Michael R. DeBaun, 2012), l'angiopathie amyloïde cérébrale (Yifeng Ling, 2019) ou l'artériopathie cérébrale autosomique dominante avec infarctus sous-corticaux et leucoencéphalopathie (i.e. CADASIL) (Annemieke Ter Telgte, 2020). Ces maladies précédentes sont connues pour exprimer un patron d'apparition de mAVC spécifiques, mais les outils permettant de déceler ces patrons d'apparition sont limités. L'utilisation de trois méthodes sont préconisées : l'histologie, imagerie par résonance magnétique (IRM) de diffusion et l'IRM 7 Tesla. L'histologie se base sur la coupe mince de cerveau fixé dans la paraffine afin de détecter les signes post mortem des mAVC. Évidemment, cette technique n'est pas envisageable d'un point de vue clinique puisque les coupes cervicales sont effectuées à la mort du patient. L'IRM de diffusion est reconnue pour permettre d'observer les mAVC aiguës (en deçà de 2 semaines). Cependant, il fût démontré que la détection de 2 mAVC aiguës pouvait représenter une incidence annuelle allant jusqu'à des centaines de mAVC (Eitan Auriel, 2015). L'imagerie répétée en IRM de diffusion afin de détecter tous les mAVC chez l'humain est un processus rigoureux demandant un temps considérable limitant la possibilité d'offrir un suivi clinique personnalisé et ainsi offrir le bon diagnostic. Finalement, l'IRM 7 tesla permettrait une résolution nécessaire afin de bien distinguer la charge des dommages vasculaires et en déceler le patron. Cependant, ce système de pointe est peu répandu et nécessite des temps d'acquisition accrus en faisant une technique sous optimale pour l'utilisation en médecine clinique.

Alors, les modèles animaux simples permettant de reproduire ces différentes observations sont nécessaires pour la compréhension de l'impact des blocages sanguins et l'utilisation de microscopes est un outil nécessaire afin d'interroger la réponse cellulaire et des tissus environnants. Différentes observations in-vivo vasculaire ont permis de constater des blocages transitoires de capillaires sanguins. Des observations d'arrêt de circulation ont été observées en microscopie deux photons (T.P. Santisakultarm, 2014) et en tomographie par cohérence optique (Sefik Evren Erdener, 2017). Ce phénomène soupçonné de contribuer à la diminution de l'influx cortical sanguin n'avait pas de mécanismes d'initiations clairs.

Dans un effort de reproduire de telles observations, différentes méthodologies ont été mises sur pied afin d'augmenter le taux d'observations in vivo de micro-occlusions transitoires. Ces méthodologies sont nécessaires dans la mesure où l'observation de micro-occlusions spontanées n'est pas chose simple sans système d'imagerie permettant un haut débit d'acquisition sur de longues durées.

La méthode d'imagerie préconisée pour examiner ce phénomène vasculaire est l'imagerie OCT. Il est possible de mettre en évidence les blocages transitoires de courtes durées (Erdener, 2017). Cependant, les conséquences à court terme sont difficiles à examiner. Afin d'augmenter le taux d'incidence de ces micro-occlusions chez les modèles animaux, plusieurs méthodologies sont disponibles telles que l'utilisation de modèles murins transgéniques (crumpler 2021), l'utilisation de la photothrombose (Giblin 2022), l'occlusion d'artère cérébrale médian (MCAO) transitoire ou permanente (Srinivasan 2013), des modèles de thrombocytémie et les modèle de polycythémie (Santisakultarm, 2014) ont tous été utilisés afin de tirer avantage du taux d'observation accrue de micro-occlusions dans ces différents modèles de maladie neurodégénérative.

Récemment, il fut démontré que l'apparition de blocages transitoires était souvent corrélée avec la présence de leucocytes dans le lumen des capillaires (J.C. Cruz Hernandez, 2019). Cette implication du système immunitaire pourrait provenir de l'inflammation généralisée qui est observée dans les maladies d'Alzheimer ou des facteurs de risques tels que l'obésité, l'hypertension ou le diabète. De plus, avec le vieillissement, un débalancement de la présence d'agents anti-oxydants permet l'augmentation de la présence des radicaux libres dans le sang contribuant à une inflammation généralisée accrue (Waqar Ahmad, 2017). Le mécanisme proposé de ces blocages transitoires serait l'adhésion des neutrophiles à la parois cellulaire endothéliale exprimant des protéines de surface cellulaire VCAM-1 et ICAM-1 interagissant avec l'intégrine, protéine surfacique, à la surface des leucocytes.

En somme, il est observé une corrélation entre l'influx cortical sanguin et les différentes neuropathologies. Bien que plusieurs mécanismes puissent influencer l'homéostasie, l'apparition de mAVC et de blocages transitoires sont deux avenues expliquant d'un point de vue microscopique une diminution totale de l'influx sanguin cortical. Ainsi, dans le cadre de ce travail de synthèse, il est soutenu que l'impact de la circulation des capillaires sanguins doit jouer un rôle premier dans le développement de ces maladies et que l'analyse et la reproduction de tels blocages doit être investiguer.

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

Dans le cadre de ce travail de recherche, le second objectif est de développer un système d'imagerie permettant de visualiser les vaisseaux sanguins tout en réduisant l'influence sur les fonctions vasculaires. Cette section est dédiée à la présentation du système d'imagerie conçu à cette fin, son système d'exploitation et les différentes réflexions de conceptualisations qui ont permis la mise en marche du microscope optique afin de permettre l'utilisation à vocation scientifique. De plus, certains détails concernant le système d'imagerie bimodal utilisé dans le premier article de cette thèse, les techniques de chirurgie et la manipulation des sujets murins sont présentés afin d'ajouter certaines précisions concernant les techniques utilisées dans ce travail de synthèse.

3.1 Système de microscopie par réflectance confocal

3.1.1 Exigences et contraintes générales

Afin de mettre sur pied un système confocal par réflectance, deux considérations générales doivent être adressées. En premier lieu, le système doit être relativement portatif puisque le montage du système et l'utilisation de celui-ci ont été faits à la Polytechnique Montréal et à l'Institut de Cardiologie de Montréal respectivement. Alors, la mise sur pied d'un système compact est un objectif de montage pour ce système de microscopie. Pour y parvenir, une platine d'expérimentation (MB4560/M) de Thorlabs fut montée sur 4 pieds afin de libérer l'espace sous la platine. Une plateforme supplémentaire est ajoutée dans cet espace afin d'y apposer de l'électronique (voir Fig 3.1). Toutes les composantes du microscope doivent reposer sur cette platine d'expérimentation ou sur la plateforme annexée (MB1530F/M) tenue par des poteaux optiques (RS3P, thorlabs). Une exception est faite pour les détecteurs étant sur un module mobile annexé. Avec cette mesure, il est assuré que le système peut facilement se déménager pour l'amener au lieu d'expérimentation (l'Institut de Cardiologie de Montréal).

En ce qui a trait à la seconde considération, l'élévation du système doit permettre la mise sous objectif de souris anesthésiées. Le dégagement nécessaire entre l'objectif de microscopie et la surface de la table optique où reposent les pieds du système doit être d'environ 30 centimètres pour permettre l'utilisation d'une plateforme mobile et ainsi assurer la possibilité de bouger la souris pendant les séances d'imagerie.

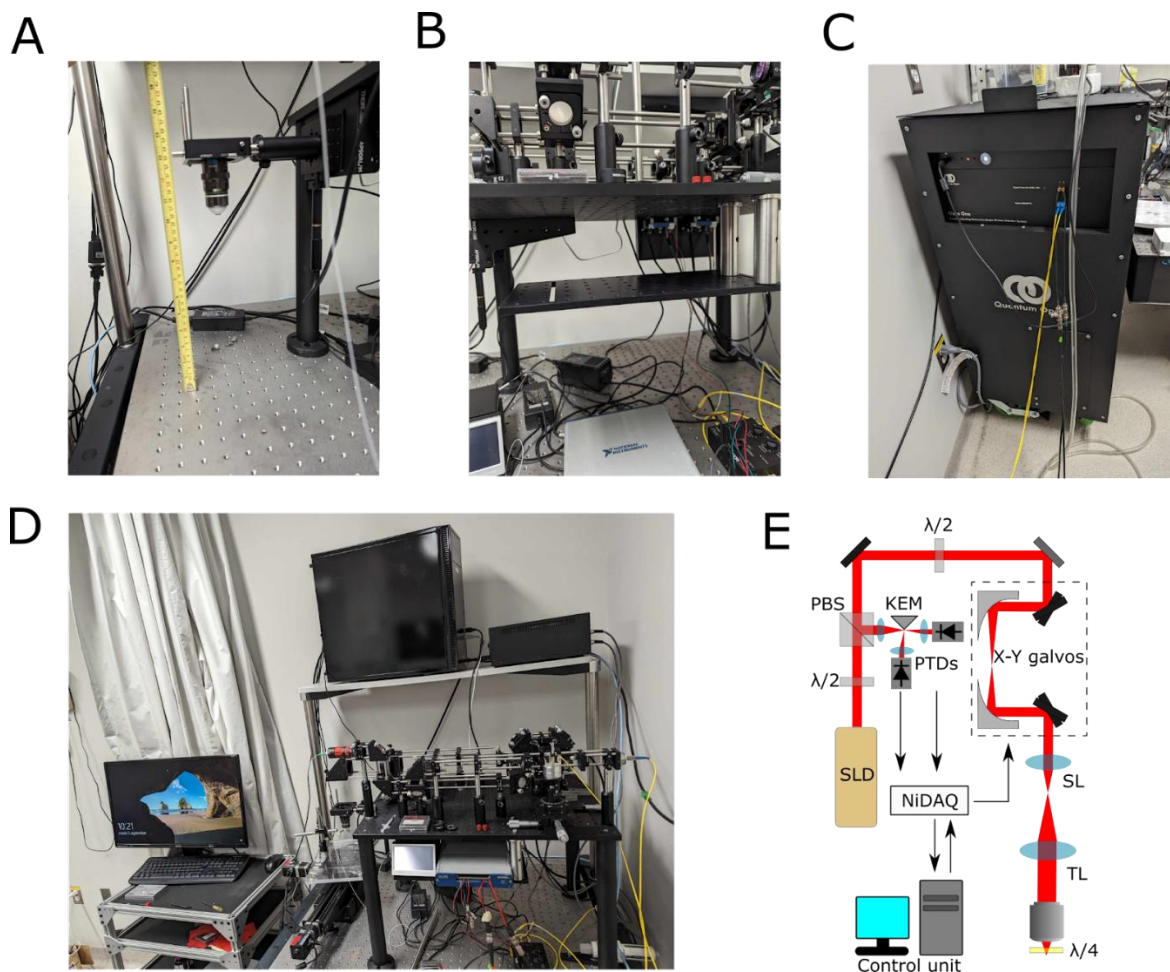


Figure 3.1: Présentation des considérations générales. Une ouverture d'environ 30 centimètres sous l'objectif de microscope doit être disponible afin d'y placer la plateforme de déplacement de la souris pendant les séances d'imagerie (A). Une plateforme annexée sous la plaquette d'expérimentation permet d'y reposer le module de contrôle de courant de la source laser et la carte d'acquisition National Instrument (B). Les détecteurs étant composés de deux compteurs de photon à nano-fibres supraconductrices (SNSPD, opus one, Quantum Opus) sont sur une plateforme mobile séparés de l'optique du microscope. Le transport de la lumière détectée se fait par fibre optique (C). L'ensemble du système d'imagerie est relativement compact et transportable. Hormis le débranchement des appareils, aucun désassemblage n'est nécessaire pour le transport complet du système. L'électronique ainsi que la plateforme permettant le déplacement des sujets murins sous l'objectif de microscopie sont présentées (D). La représentation schématique du système d'imagerie dans son ensemble ainsi que les différentes parties optiques sont présentées dans la section ci-dessous (E).

3.1.2 Conception et considérations optiques

Le système d'imagerie confocal construit dans le cadre de ce projet a comme vocation d'imager les tissus biologiques par la réflexion provenant des tissus dans la plage spectrale NIR-II (Fig. 3.2). Afin de permettre cette modalité d'imagerie, la source laser utilisée doit être dans cette plage de longueur d'onde. La source laser utilisée est la (FPL1059P) de Thorlabs montée sur un module de contrôle de courant (CLD1015). Cette source a comme particularités d'être fibrée et de conserver sa polarisation à la sortie de la fibre. Cette source cohérente à 1650 nm se termine par un connecteur fibré FC/APC doit être alimentée en courant d'un minimum de 45 mA jusqu'à un maximum de 500 mA. Ce domaine de valeurs de courant s'accompagne de différentes valeurs de longueur d'onde centrale de l'émission optique ainsi que la puissance en sortie de la fibre. Ainsi, le contrôle de la puissance par la modification du courant à la source est possible, mais implique des changements des caractéristiques de la source (changement spectral).

Puisque la source se termine par un connecteur FC/APC, la collimation de la source dans le système d'imagerie doit être pourvue du même type de connecteur. À cette fin, un dilateur de faisceau compatible (ZC618APC-C, Thorlabs) est utilisé. Cette dernière composante permet de contrôler le diamètre du faisceau laser. Les différents diamètres de faisceaux accessibles sont accompagnés de leur divergence respective imposant une optimisation quant aux paramètres à utiliser. Dans le cas de notre système d'imagerie, un diamètre de faisceau laser d'environ 3mm est désiré. Ce paramètre sera une contrainte quant au restant du système puisque nous désirons élargir une seconde fois le faisceau laser afin de bien remplir la face arrière de l'objectif de microscopie. À 3 mm de diamètre après le dilateur de source laser, la stabilité du diamètre est d'environ 10% sur 3 mètres de parcours optique. Sachant que le parcours optique total du système avoisine les 2 mètres, nous sommes assurés que le parcours optique est en deçà d'un agrandissement trop important causé par la divergence du faisceau laser.

L'utilisation d'un laser NIR-II de spectre mince est sujette à des réflexions spéculaires sur la surface des composantes optiques utilisées dans le système d'imagerie. Ces réflexions peuvent être atténuées par le biais d'une déposition de couches diélectriques minces sur les lentilles assurant une meilleure transmission. Ainsi, toutes les composantes dans le système décrit sont recouvertes

d'une couche électrique nommée "C" par la compagnie Thorlabs. Cette déposition de couches diélectriques est optimisée pour la plage spectrale de 1050 nm à 1700 nm et cette dernière offre une réflectance d'environ 0.25% à 1650 nm. Réduisant grandement les pertes optiques du système, le signal capté provenant de la réflexion et optimise la puissance délivrée à l'échantillon.

Afin de minimiser la détection provenant des réflexions du faisceau d'excitation sur les lentilles du système, le système est conçu afin de différencier par la polarisation la lumière source et la lumière provenant de l'échantillon. C'est dans ce contexte que la source fibrée conservant la polarisation de la diode est mise à profit. Suivant le dilatateur de faisceau, une lame demi-onde est placée préalablement à un cube de séparation de polarisation offrant un contrôle manuel de la puissance injectée dans le système de microscopie. La lame demi-onde a pour but d'orienter la polarisation d'entrée dans le cube de séparation. Ce cube a pour fonction de laisser passer la polarisation verticale dans le système et de diriger la lumière détectée avec une polarisation horizontale vers les détecteurs. Cette rotation de polarisation est causée par une lame quart d'onde qui sera décrite plus loin dans ce document.

Suivant le cube de polarisation, la source d'illumination est dirigée dans une seconde lame demi-onde ayant pour fonction de tourner la polarisation de 90 degrés de la source et la détection. Cette lame assure que la polarisation de la lumière détectée et la lumière d'excitation sont perpendiculaires l'une à l'autre et doit être placée afin de réduire le signal non désiré de la réflexion aux détecteurs. Plus d'informations sont disponibles dans la section discutant de la routine d'alignement. Par suite, le faisceau d'illumination est dirigé dans un système de balayage du faisceau constitué de 2 miroirs galvanométriques et 2 miroirs paraboliques fixes. Cette unité de balayage a pour fonction de conjuguer optiquement la surface des deux miroirs galvanométriques et d'éviter la translation du faisceau laser à la distance de travail de la lentille de balayage (*front working distance*). Ainsi, un changement angulaire d'un miroir galvanométrique ne cause pas de translation sur la surface du second miroir de balayage. Cette mesure assure une diminution de la déformation de l'image associée à cet effet. Il est à noter que les miroirs sont positionnés de façon à balayer des axes orthogonaux dans le plan de l'imagerie afin de permettre l'enregistrement d'une image en deux dimensions.

Par la suite, un télescope gaussien constitué de deux lentilles (AC254-050-C, ACT508-300-C) élargit le faisceau laser d'illumination par un multiple de 6. Cette modification de diamètre permet au faisceau laser de remplir la face arrière de l'objectif de microscopie et de tirer avantage de la grande ouverture numérique (XLPLN25XWMP2, Olympus). Une grande ouverture numérique assure par l'effet confocal un sectionnement optique optimal et une livraison hautement focalisée du laser d'illumination. La dernière pièce d'optique essentielle au bon fonctionnement de la séparation entre le faisceau laser d'illumination et la détection est une lame retardatrice quart d'onde placée sous l'objectif de microscopie. Afin de tenir cette lame retardatrice sous l'objectif, elle est utilisée comme fenêtre crâniée lors des acquisitions de microscopie. Ainsi, lorsque placée afin d'optimiser l'effet retardateur, un va-et-vient de la lumière cause l'équivalent d'une lame retardatrice demi-onde causant une rotation de 90 degrés de la polarisation de la lumière. La lumière réfléchi est alors captée par l'objectif et renvoyée dans le système où la lumière détectée est polarisée perpendiculairement à la lumière d'excitation. Cette dernière parcourt le trajet optique de la source dans le sens inverse. À l'arrivée au cube de séparation de polarisation, la lumière captée est déviée en direction du parcours de détection.

Le parcours de détection permettant le contraste de phase est constitué d'une première lentille (LA1134-C, Thorlabs) focalisant la lumière détectée de l'échantillon sur la bordure d'un miroir en coin (MRAK25-P01, Thorlabs) afin de séparer en deux parties de la lumière provenant de l'échantillon. Chaque moitié est collectée par une lentille de 60 mm (LA1134-C, Thorlabs) et envoyée dans un collimateur fibré (PAF2P-18C, Thorlabs). La lumière est ensuite envoyée dans des compteurs de photons (SNSPD, Opus one, Quantum opus) servant de détecteurs.

Cependant, il est à noter que ce système d'imagerie est un système confocal. Ce type de système nécessite un sténopé afin de créer un sectionnement optique qui ne semble pas être apparent dans la présentation du système. Ce système utilise des parcours fibrés pour la détection. Ainsi, lors de la focalisation de la lumière détectée dans la fibre optique par le collimateur, l'ouverture du cœur de la fibre optique incarne la fonction du sténopé. Pour avoir une estimation de la segmentation optique, il faut considérer le diamètre de la lumière détectée avant la focalisation du collimateur. Ce faisceau détecté a un diamètre semblable à l'excitation laser d'environ 3.2 mm à l'entrée du collimateur. Elle est ensuite focalisée sur une distance de 18.4 mm dans la fibre ayant un diamètre

interne de 10 μm . Ainsi, le calcul du disque d'Airy par la focalisation indique que le sténopé correspond à 0.8 unité d'Airy assurant l'effet confocal à l'entrée de la fibre optique.

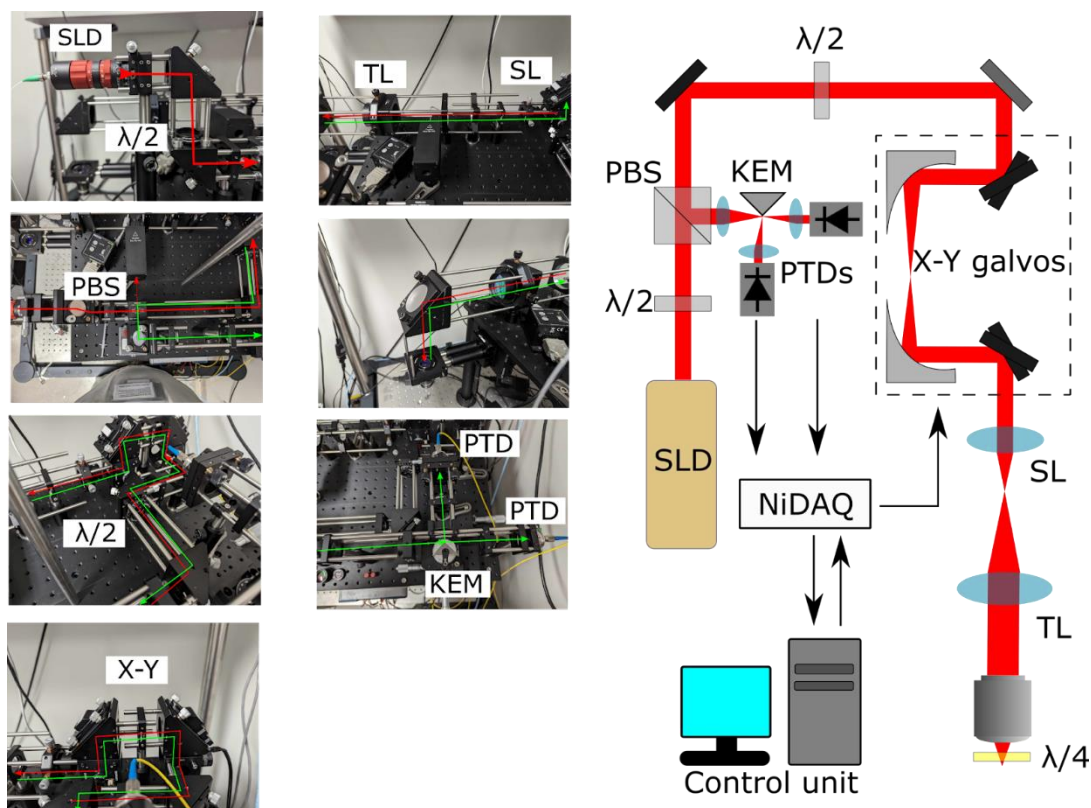


Figure 3.2 : Présentation physique du système d'imagerie. Le parcours de la lumière d'excitation est représenté par le tracé rouge sur les photos du système. Le parcours de détection est représenté par le tracé vert. Les trajets sont spatialement superposés. Cependant il est à préciser que l'orientation de la polarisation des deux trajets est orthogonale l'une par rapport à l'autre en tout point. SLD: source de diode superluminescente. $\lambda/2$: lame demi-onde. PBS: cube de séparation de polarisation. X-Y : miroirs galvanométriques. SL: Lentille de balayage. TL: Lentille tube. KEM: miroir en coin. PTD: entrée aux détecteurs. $\lambda/4$: lame quart d'onde. La lame quart d'onde n'est pas présentée puisqu'elle sert de fenêtre crâniale. Cette dernière se place sous l'objectif de microscopie permettant ainsi la rotation de polarisation.

3.1.3 Exigences optomécaniques

La partie optique du système confocal ayant été décrite dans son ensemble, certaines pièces clés nécessitent des degrés de liberté précis afin de mettre sur pied un tel système. Premièrement, la seconde lame retardatrice demi-onde (après le cube de séparation de polarisation dans le parcours) doit avoir la possibilité de tourner sur elle-même afin de permettre une orientation de l'axe rapide optimale. L'orientation de cette lame doit minimiser le signal retournant aux détecteurs. Deuxièmement, l'orientation de la lame retardatrice quart d'onde est aussi une variable importante à optimiser. En plaçant cette dernière lame comme fenêtre crâniale, tourner la lame afin d'optimiser la rotation de polarisation implique la nécessité de tourner le sujet murin. Alors, mettre sur pied une plateforme de soutien de l'animal permettant la rotation de la souris est nécessaire afin d'optimiser le signal détecté par le système de microscopie. La dernière considération importante au système est le nombre important de degrés de liberté que nécessite le prisme afin d'assurer une redirection optimale de la lumière détectée. Dans la conceptualisation de ce système, il a été assuré que le prisme peut tourner autour des 3 axes dimensionnels et peut se mouvoir en translation dans le plan de la table optique. Ces 5 degrés de liberté permettent une coupe et redirection optimale de la lumière vers les détecteurs.

3.1.4 Acquisition des images

L'opération du système d'imagerie nécessite une architecture électronique permettant la synchronisation des miroirs galvanométriques et l'acquisition du signal provenant des compteurs de photons. À cette fin, une carte d'acquisition (USB X series multifunction DAQ, National Instrument) est utilisée avec un ordinateur afin d'orchestrer le mouvement des miroirs et la formation de l'image. La première partie consiste à injecter des signaux électriques en forme de rampe afin de couvrir le champ de vue du microscope (voir Fig. 3.3). Ce signal électrique est interprété par les miroirs qui répondent par un mouvement de rotation proportionnellement à l'intensité du signal reçu. Ainsi, chaque valeur de voltage correspond à un angle précis et permet de cartographier l'espace d'imagerie en deux dimensions à l'aide de deux de ces miroirs placés orthogonalement. En acquérant les données provenant des détecteurs de façon synchrone, il est possible de reformer l'image afin de reproduire ce que les miroirs ont balayé comme structure.

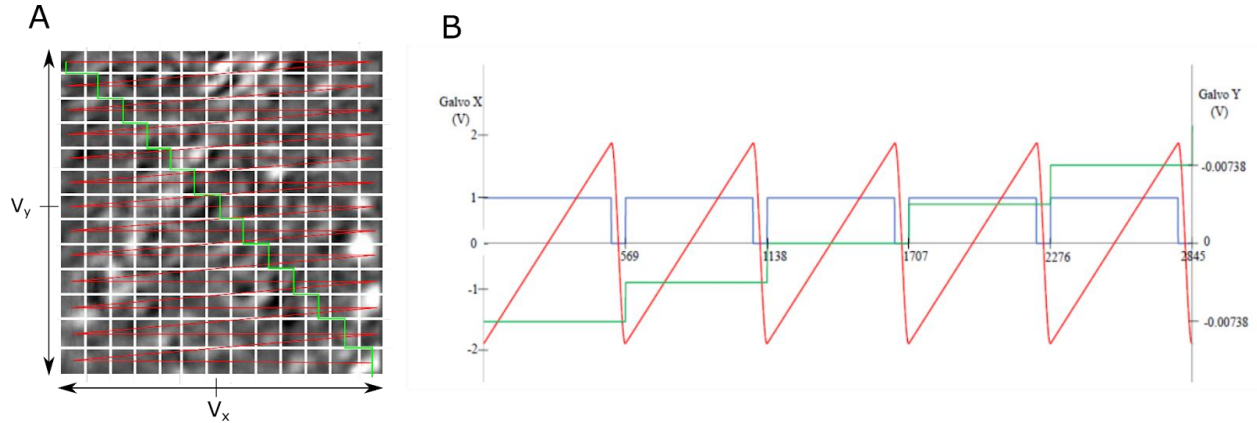


Figure 3.3 : Exemple de signaux électriques en rampe envoyés aux miroirs galvanométriques dans le cadre d'une acquisition d'image. Afin de reconstruire une image en 2D, les miroirs galvanométriques doivent parcourir le plan d'imagerie (A). Cette structure d'acquisition est nommée une acquisition en dent de scie par sa forme caractéristique du balayage de l'axe rapide. Le signal de l'axe rapide représenté par la courbe rouge effectue un balayage complet du domaine de valeur du voltage représentant le champ de vue horizontal de l'image et revient au point de départ à l'aide d'une courbe polynomiale de degré 3. Le second axe ou le miroir lent effectue un balayage de valeur de voltage complet représentée par la courbe verte. Cette courbe parcourt le champ de vue vertical de l'image. La courbe en bleu représente le domaine temporel d'acquisition d'image afin de rejeter les données provenant du retour des miroirs galvanométriques (B). Cette image provient de Castonguay 2017.

Déterminer la différence de potentielle électrique requise afin de remplir le champ de vue du microscope est essentiel afin d'utiliser de façon optimale le balayage des miroirs galvanométriques. Pour se faire l'utilisation de trigonométrie avec les caractéristiques de l'optique permettent d'établir une relation d'angles nécessaires avec le champ de vue du microscope.

$$\theta_{max} = \text{atan}(f_2 * FOV / (2 * f_1 * f_{obj})) \quad (26)$$

Où θ_{\max} représente l'angle maximal du miroir galvanométrique afin d'atteindre l'extrémité du champ de vue du microscope et FOV représente la longueur physique du champ de vue. Les valeurs f_1 , f_2 et f_{obj} représentent les longueurs focales effectives de la lentille de balayage, de la lentille tube et de l'objectif de microscope respectivement. La démonstration de cette équation est disponible dans la référence Castonguay 2017. Ainsi, en connaissant la réponse de rotation des miroirs galvanométriques par unités de voltage du signal, l'intensité maximale du signal électrique dans chaque miroir galvanométrique devrait correspondre à l'angle maximale ci-haut.

3.1.5 Procédure d'alignement

Une procédure d'alignement optimisée est nécessaire afin de faciliter l'utilisation du système d'imagerie de façon optimale. Dans le cadre de la conception du système, la procédure d'alignement a été rédigée afin de permettre une pérennité du système d'imagerie au sein du laboratoire. Une description abrégée est présentée afin d'ajouter à la liste de manipulation du protocole en annexe à ce document (Annexe 1 : Protocole d'alignement.).

Premièrement, l'alignement optique de la source laser jusqu'à la face arrière de l'objectif de microscopie doit être effectué. Afin de faciliter la tâche, il est possible d'enlever les lentilles optiques du système et d'ajuster le parcours de la lumière d'excitation à l'aide des boulons d'orientation des miroirs. Il est important d'utiliser l'avantage du système de cage optique et des outils d'ajustement appropriés afin de conserver le faisceau laser centré tout au long du parcours optique. Une fois cette étape effectuée, il est nécessaire de superposer le trajet optique de la détection sur le parcours optique de l'excitation. Pour éviter un alignement de la détection à l'aveuglette, il est possible et grandement conseillé d'injecter une source laser dans le collimateur de détection et de superposer les parcours d'excitation et de détection à l'aide de cartes d'alignement.

Suivant cette superposition, l'ensemble des lentilles peuvent être placées dans leurs socles dédiés et la superposition des faisceaux doit être validée une seconde fois. Le miroir en coin peut alors être mis en place afin de couper le faisceau laser en deux. Le laser injecté dans le bras de détection doit être ensuite déconnecté. Un miroir doit être placé sous l'objectif de microscopie et la hauteur ajustée jusqu'à la visualisation de la réflexion dans le bras de détection. Le miroir en coin peut

alors être placé de façon à créer une coupure optique décrite par l'effet de Foucault. Lorsque réussies, la rotation du miroir en coin et la rotation dans les 3 axes dimensionnels permettent la redirection de la lumière réfléchiée par le miroir en coin dans le second détecteur.

3.2 Système bimodal : multiphoton et tomographie par cohérence optique

Afin de permettre l'imagerie moléculaire et intrinsèque des vaisseaux sanguins, un système bimodal est utilisé dans le cadre du premier objectif de cette thèse. Ce système ayant pour but de corroborer le blocage des vaisseaux sanguins utilise une méthode d'imagerie intrinsèque (OCT) combinée à une modalité moléculaire (Deux photons). Une description brève du système de microscopie bimodale est offerte ainsi que les propriétés relatives à l'utilisation de ce système.

3.2.1 Aperçu du système

Le système combinant modalité intrinsèque et moléculaire est possible grâce aux longueurs d'onde différentes utilisées pour les deux méthodes d'imagerie. La Fig. 3.4 présente le système bimodal sous forme schématisée. L'OCT utilisant une longueur d'onde centrale de 1310 nm (LS2000C, Thorlabs) ne superpose pas spectralement avec la plage spectrale du laser deux photons (Mai Tai, Spectra physics) allant de 680 nm à 1040 nm. Ainsi, l'utilisation d'un miroir dichroïque permet la superposition des parcours optique dans la face arrière de l'objectif. En tirant profit de la séparation spectral qu'offre l'imagerie deux photons, il est aussi possible de rediriger la lumière provenant de la fluorescence vers des tubes photomultiplicateurs à l'aide d'un second dichroïque, et ce sans réfléchir la lumière d'excitation de l'OCT et la source d'excitation multiphotonique.

Chaque système est indépendamment contrôlé à l'aide de cartes d'acquisition (multifonction DAQ, National Instrument) implémentées sur un ordinateur unique. Dans le cas de notre projet, la synchronisation des systèmes n'était pas un facteur clé afin de corroborer l'imagerie OCT de deux photons, puisque nous désirions seulement confirmer l'état d'irrigation des vaisseaux sanguins avant et après les manipulations (voir chapitre 4). En ce qui a trait au balayage des miroirs galvanométriques, la procédure d'acquisition est identique à ce qui est présenté plus haut dans la partie du développement du microscope confocal. Chaque modalité détient des miroirs galvanométriques dédiés, conjugués optiquement par des miroirs paraboliques. Pour l'OCT spectral, les spectres d'interférence entre le miroir de référence et le tissu sont détectés par le biais

d'un spectromètre et enregistrés directement sans post-traitement. Cette mesure a pour but de réduire le temps d'enregistrement et d'éviter que la mise sur disque bloque la prise de données. Les paramètres de l'image (grandeur physique, nombre de pixels) sont enregistrés avec les données pour fin de reconstruction. Le système d'imagerie OCT, nécessitant une écriture rapide au disque et une vitesse d'exécution optimale, est implémenté en C++ et opéré à l'aide du programme Qt. Pour le microscope deux photons, la mécanique de balayage des miroirs galvanométriques est identique, mais la détection est fournie par des tubes photomultiplicateurs connectés à des amplificateurs. Le signal de sortie est redirigé vers la carte d'acquisition dédiée et l'accumulation synchrone des données avec les balayages des miroirs est enregistrée afin d'en reconstruire les images. La partie deux photon du microscope est implémentée en Python 3.2 et est exécutée au sein de la plateforme Liclipse (Eclipse). L'utilisation des deux modalités avec leur plateforme respective permet une aisance quant au contrôle des acquisitions.

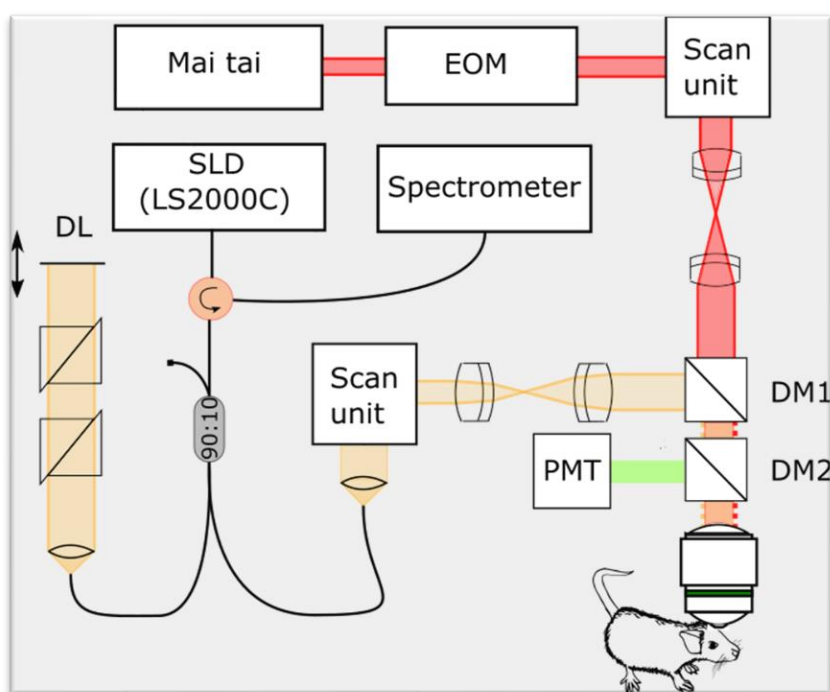


Figure 3.4: Présentation du système bimodal sous forme de schéma. Deux systèmes d'imagerie sont combinés par le biais d'un filtre dichroïque passe-bas. Un OCT spectral fibré est composé d'une source peu cohérente (SLD) divisée avec un ratio de 10% et 90% vers le trajet optique de référence et le trajet optique allant à l'échantillon (cortex murin) respectivement. La ligne de délai (DL) dans le bras d'échantillon est munie de cube de dispersion afin de corriger la dispersion dans le verre de l'optique du microscope. L'unité de balayage des miroirs galvanométrique (Scan unit)

permet le déplacement du point laser au plan d'imagerie. Le miroir dichroïque passe-bas (DM1) redirige la lumière de l'OCT vers la surface corticale. La réflexion de chaque bras est collectée et transmise au spectromètre par le biais d'un circulateur fibré. Le système Deux photons est superposé sur le parcours de l'OCT par le biais du miroir dichroïque passe-bas (DM1) et est aussi dirigé par un système de balayage. Afin de contrôler la puissance de sortie du laser, un obturateur électro-optique à cellule de Kerr est placé dans le parcours du laser. Afin de collecter la lumière émise par l'effet multiphotonique, un second dichroïque passe haut (DM2) redirige la fluorescence vers les tubes photomultiplicateurs.

3.2.2 Procédure d'alignement du système bimodal

Ce système combinant OCT et Deux photons ne serait pas très utile s'ils ne partageaient pas un champ de vue semblable afin d'y analyser les mêmes composantes corticales. Suivant l'alignement conventionnel des trajets d'optiques individuels, il est possible d'assurer une superposition des champs de vue par la méthodologie suivante. Une parcelle de colle optique (Norland 61) est déposée sur une lamelle de microscopie et durcie par le biais d'expositions à la lumière UV. Par la suite, cette lamelle est placée sous le microscope bimodalité. Afin de trouver la surface de la colle optique, l'imagerie OCT en continu permet de placer le plan de l'imagerie sous la surface de la colle durcie. Par le biais du microscope deux photons, une grille de voltages est envoyée aux galvos et le laser Mai Tai est actionné afin d'exposer la colle à la source d'illumination (900 nm, 400 mW). Cette exposition provoque un changement de structure dans la colle perceptible à l'OCT. Ainsi, l'alignement de l'OCT afin de centrer le grillage gravé au centre de l'image détectée peut s'effectuer par le biais de translations au niveau de la lentille tube ou la rotation optomécanique des miroirs galvanométriques. L'addition d'une valeur de voltage constante lors du balayage des miroirs galvanométriques ayant pour but d'ajuster le champ de vue est une seconde option tout à fait viable.

3.3 Chirurgies crânielles pour fin d'imagerie

Une partie prenante de l'imagerie corticale est la méthodologie utilisée afin de révéler la surface du cerveau. Comme mentionné plus tôt, différentes méthodologies existent dans la littérature scientifique, mais cette section se concentre sur les techniques utilisées dans le cadre de ce travail de synthèse. Cette section est dédiée à une brève présentation des outils permettant l'imagerie

corticale murine par le biais de la craniotomie suivie de l'installation d'un hublot et d'une barre de fixation afin de maintenir la tête.

3.3.1 Procédure d'anesthésie

Afin de permettre la mise en place d'une fenêtre crâniale sur les sujets murins, l'anesthésie est primordiale afin de diminuer la souffrance causée chez l'animal et les inconforts pouvant en résulter. Pour ce faire, des outils spécialisés afin de surveiller les signes vitaux (électrocardiogramme, respiration et température) et fixer l'animal sont utilisés dans les procédures de craniotomie. Cet outil de surveillance est présenté à la Fig. 3.5a. Cette plateforme est équipée de ports d'entrée et de sortie pneumatique afin de laisser circuler une mixture d'oxygène et d'isoflurane causant l'anesthésie chez l'animal. Afin d'initier l'anesthésie, une boîte en acrylique équipée de ports pneumatiques est disponible afin d'y déposer l'animal. Un distributeur d'isoflurane y est connecté. Cet outil est nécessaire afin de réguler le débit d'oxygène et la concentration d'isoflurane à 2 litres par minute avec une concentration de 2% à 3% respectivement. Une concentration plus élevée afin d'initier l'anesthésie est recommandée, suivie d'une réduction de la concentration pour maintenir l'état de l'animal. La sortie pneumatique est connectée au système de succion d'air fourni par l'immeuble.

Suivant l'anesthésie dans la boîte d'acrylique, l'animal peut être manipulé afin de le fixer sur la plateforme surveillant les signes vitaux. Le distributeur d'isoflurane est ensuite connecté au système de transport d'air de la plateforme de surveillance et la concentration d'isoflurane est réduite à 2%. Le système de succion d'air est aussi connecté à la plateforme. Une fois l'animal installé, une crème oculaire est placée sur les yeux de l'animal afin d'éviter une sécheresse oculaire importante durant le protocole. Afin de restreindre les mouvements de la tête durant la procédure, deux extrusions métalliques annexées à la plateforme sont fixées aux entrées des canaux auditifs de l'animal. Ensuite, une crème dépilatoire est apposée sur le crâne de l'animal pendant 20 à 30 secondes. Elle est nettoyée avec du tissu en assurant qu'aucun poil ne reste sur la surface du scalp. Un gel anesthésiant (xylocaïne) est appliqué sur la surface exposée et une injection de saline de 5mL est induite entre le scalp et la surface de crâne. Par suite, une paire de ciseaux chirurgicale stérilisée est utilisée afin de retirer le scalp et d'en exposer la surface du crâne. Une compresse de gaze est utilisée afin d'éponger le sang et de bloquer les écoulements sanguins en bordure de la coupe chirurgicale. De la colle à tissu biologique (Vetbond) est utilisée afin de fixer la peau au

crâne. Par la suite, les tissus conjonctifs restant sur la surface du crâne sont nettoyés à l'aide de Coton-Tige. L'animal est ensuite prêt à la mise en place de la fenêtre crâniale démontré à la Fig. 3.6 et décrite ci-bas.

3.3.2 Craniotomie pour séance d'imagerie aiguë (microscopie par réflectance confocale)

Afin de permettre l'imagerie aiguë en microscopie par réflectance confocale, la fenêtre crâniale doit être une lame quart d'onde afin de causer une rotation de polarisation lors du va-et-vient de la lumière au travers ce hublot. C'est pourquoi les lames quarts d'onde sont coupées en forme carrée d'une grandeur approximative de 2,5 mm. Pour permettre un placement optimal du hublot, ce dernier est déposé sur la surface du crâne et le contour du hublot est dessiné sur le crâne à l'aide d'un marqueur. Ce tracé peut ensuite être utilisé comme guide pour la perceuse médicale (Dremel) afin d'amincir le crâne le long du parcours jusqu'au détachement du crâne. Des pinces sont utilisées afin d'extirper la section de crâne laissant place au hublot. Dans le cas d'un saignement cortical, une compresse de gaze humidifiée avec de la saline peut servir à éponger le surplus sanguin. Un temps d'attente peut être nécessaire afin d'éviter un saignement cortical sous la fenêtre crâniale. Le hublot est ensuite inséré dans le trou et poussé délicatement sur la surface du crâne et maintenu en place au moyen d'un bras mécanique sur mesure. De la colle dentaire est ensuite apposée sur le pourtour de la fenêtre crâniale afin de fixer le hublot au crâne. Une exposition à la lumière UV durant 20 secondes solidifie la colle dentaire fixant ainsi le hublot en place. Par suite, le bras mécanique est retiré et une barre de titane fait sur mesure pour la fixation crâniale de souris est apposé avec de la colle dentaire et solidifiée en place. La souris peut alors être transportée au système d'imagerie pour effectuer les acquisitions nécessaires. À la fin de la séquence d'imagerie, l'animal est sacrifié, la barre de titane est récupérée et l'acquisition se termine.

3.3.3 Craniotomie pour séance d'imagerie chronique (microscopie deux photons et OCT)

Afin de permettre des études longitudinales, la possibilité d'installer un hublot crânial stable dans le temps est nécessaire. Dans le cadre de ce projet de synthèse, un tel hublot est nécessaire afin d'observer les fonctions des vaisseaux sanguins dans le temps. Pour ce faire, la méthode d'installation de hublot crânial est semblable à la section précédente en ce qui a trait aux manipulations chirurgicales nécessaires. Cependant, la fenêtre n'est pas constituée d'une lame quart d'onde carré puisque la rotation de polarisation n'est pas nécessaire aux séquences d'imagerie

(microscopie deux photons et OCT). Une lamelle couvre-objet rond ayant un diamètre de 3 mm est utilisée comme fenêtre crâniale dans le cadre d'étude chronique. Ces lamelles rondes sont préférables aux fenêtres carrées coupées sur place puisqu'elles ne présentent pas de pointe sur leur périphérie pouvant engendrer des lésions sur la surface corticale. Ainsi, ces lamelles rondes sont plus stables dans le temps et moins opportunes à provoquer des saignements sous le hublot cortical. Suivant la chirurgie d'installation, des doses d'anesthésiant (Buprénorphine) et d'anti-inflammatoires (Kétoprofène) sont injectées à l'animal afin de prévenir la souffrance et l'inflammation.

L'avantage supplémentaire des fenêtres d'imagerie chronique est la possibilité d'acquérir des images à l'éveil. Pour y arriver, la souris est installée sur une roue et maintenue à la tête par le biais de la barre de titane. Une fourche métallique faite sur mesure peut s'attacher à la barre par le biais de visse (Fig. 3.6 E). Afin de réduire le stress chez l'animal que pourrait causer une longue fixation de la tête, une séquence d'entraînement sur quatre jours est prévue dans le protocole allant de séances d'une durée de 10 minutes jusqu'à 45 minutes. Dès cet entraînement terminé, l'animal est disponible afin d'effectuer les séquences d'imagerie nécessaire au projet.

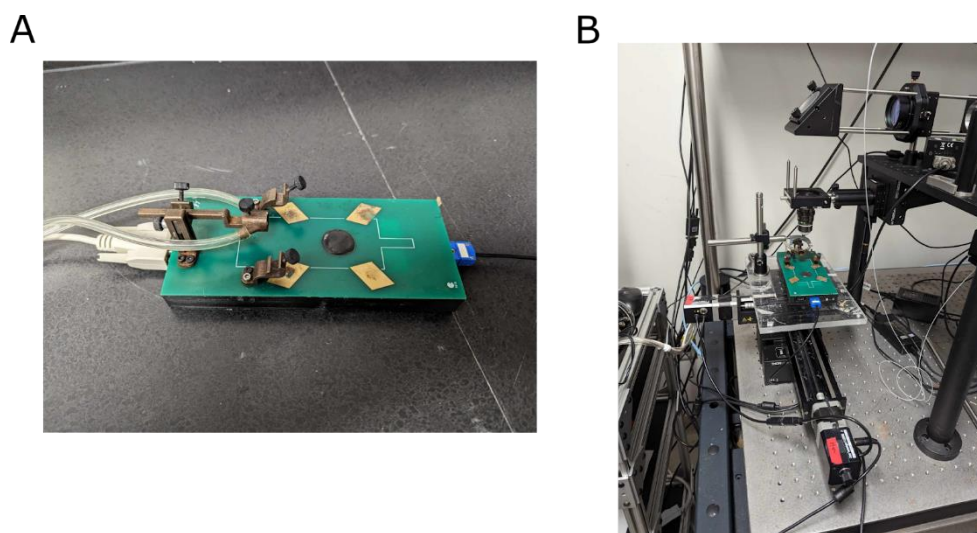


Figure 3.5 : Présentation de la plateforme de surveillance de signes vitaux. (A) La plateforme permet de surveiller l'électrocardiogramme et la respiration de l'animal durant les procédures chirurgicales. (B) Cette plateforme est compatible avec le système d'imagerie confocal afin d'acquérir

des images corticales sous anesthésie. Une fourche supplémentaire sur laquelle la barre de titane est fixée permet de tourner la tête afin d'assurer que la surface du hublot soit parallèle à l'axe optique. Cette même fourche peut être utilisée en acquisition aiguë ou chronique afin de corriger l'angle de la surface du hublot. La plaque n'étant pas fixée sur la surface de la plateforme mobile, il est possible de tourner la souris afin d'y aligner de façon optimale la lame quart d'onde.

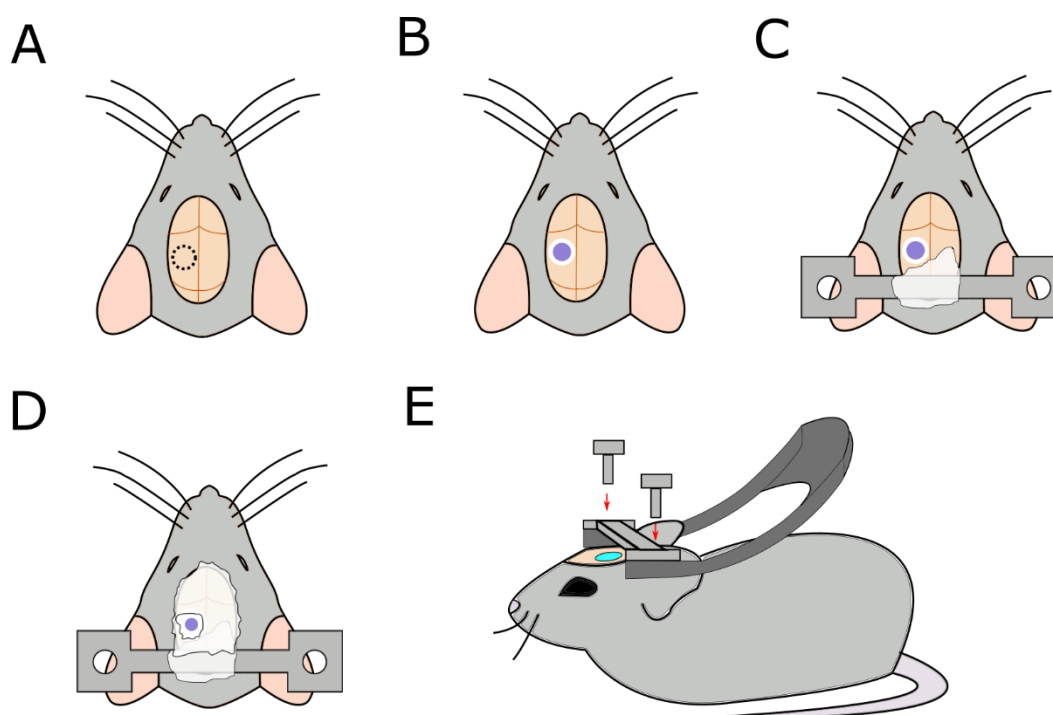


Figure 3.6 : Présentation schématique de la chirurgie crâniale et de la fixation de la tête. Le scalp de la souris est retiré et les tissus conjonctifs sont enlevés. Un marquage est fait de diamètre semblable à la fenêtre crâniale (A) et le morceau circulaire de crâne est retiré afin d'y apposer la fenêtre crâniale fixée à l'aide de colle dentaire (B). La barre de fixation crâniale en titane est apposée une première fois avec de la colle dentaire (C) et ensuite solidifiée avec l'ajout de colle recouvrant complètement la surface crâniale (D). La tête de la souris est ensuite fixée à l'aide de fourches fabriquées sur mesure et la fixation s'effectue par le biais de vis (E). Cette fourche est maintenue par un bras mécanique mobile permettant l'orientation de la tête afin de limiter les aberrations optiques provenant d'un mauvais alignement de la fenêtre crâniale.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : TARGETTED CAPILLARY PHOTOTHROMBOSIS VIA MULTIPHOTON EXCITATION OF ROSE BENGAL

Ce premier article aborde le premier objectif de la thèse. Il présente l'utilisation d'un agent photothrombotique conventionnel nommé le Rose bengal via un mécanisme d'excitation multiphotonique. Cette méthodologie présentée offre des avantages tels que : la meilleure pénétration de la lumière par l'excitation biphotonique utilisant une source laser de 1000nm, une segmentation du plan d'illumination permettant une sélectivité accrue des vaisseaux sanguins ciblés et une précision permettant le ciblage des capillaires sanguins. Afin d'observer la réponse des capillaires sanguins visée, il a été utilisé une modalité d'imagerie d'angiogramme par OCT. De plus, afin de connaître les mécanismes responsables des blocages sanguins observés, une étude histologique a permis de conclure que le processus d'inflammation provenant de l'excitation du Rose Bengal est un facteur primaire et que les blocages temporaires sont les conséquences de la présence des neutrophiles dans le système sanguin se logeant dans les capillaires ciblés par des facteurs d'adhésions moléculaires. Cet article a été publié au journal *Journal of Cerebral Blood Flow and Mecanisms* le 17 janvier 2023. Cet article est une version plus approfondie du travail présenté le 5 mars 2021 présenté au SPIE BiOS 2021 nommé *Multiphoton excitation or Rose Bengal to induce capillary photo-thrombosis*.

Authors : Patrick Delafontaine-Martel^{1,2}, Cong Zhang^{1,2}, Xuecong Lu^{1,2,4}, Rafat Damseh^{1,2,5}, Frédéric Lesage^{1,2}, Paul J. Marchand^{1,2,3}.

1. Département de génie électrique, Polytechnique Montréal, Montréal, Canada
2. Institut de cardiologie de Montréal, Montréal, Canada
3. École Polytechnique fédérale de Lausanne- EPFL, lausanne, Suisse
4. DeGroot School of business- McMaster University, Ontario, Canada
5. College of Information Technology, United Arab Emirates University, Al Ain, Emirats Arabes Unis.

Abstract : Microvascular stalling, the process occurring when a capillary temporarily loses perfusion, has gained increasing interest in recent years through its demonstrated presence in

various neuropathologies. Studying the impact of such stalls on the surrounding brain tissue is of paramount importance to understand their role in such diseases. Despite efforts trying to study the stalling events, investigations are hampered by their elusiveness and scarcity. In an attempt to alleviate these hurdles, we present here a novel methodology enabling transient occlusions of targeted microvascular segments through multiphoton excitation of Rose Bengal, an established photothrombotic agent. With $n=7$ mice C57BL/6 J (5 males and 2 females) and 95 photothrombosis trials, we demonstrate the ability of triggering reversible blockages by illuminating a capillary segment during ~ 300 s at 1000 nm, using a standard Ti:Sapphire femtosecond laser. Furthermore, we performed concurrent Optical Coherence Microscopy (OCM) angiography imaging of the microvascular network to highlight the specificity of the targeted occlusion and its duration. Through comparison with a control group, we conclude that blood flow cessation is indeed created by the photothrombotic agent via multiphoton excitation and is temporary, followed by a flow recovery in less than 24h.

4.1 Introduction

Recent studies have highlighted the role of an increase in transitory losses of perfusion in capillaries (so-called capillary stalls) in various pathologies. An increase in the frequency and duration of such events has been observed in Alzheimer's disease¹, acute stroke² and following targeted occlusion of a penetrating arteriole³. Using two-photon microscopy, Cruz Hernandez et al. found these stalls to be caused by the temporary adhesion of neutrophils to the capillary wall, ultimately blocking the passage of red blood cells (RBC)¹.

Despite the increasing evidence for the presence of stalls in these neuropathologies, studying their impact on the neighboring tissue is cumbersome, due to their spatial and temporal rarity⁴. Simulations have highlighted the potential of such flow interruptions in causing hypoxic pockets⁵, as seen in elderly mice⁶, however *in vivo* evidence highlighting the causal relationship between both observations is still lacking. Moreover, Schmid et al. pointed out through simulations that vessel topology is a factor determining the local impact of stalls, but validation of these predictions are still to be confirmed in an *in vivo* setting⁷. Current investigations of capillary stalling rely primarily on very long acquisition times, to maximize the probability of observing these events. Although the aforementioned methodology enables mapping of relatively large microvascular

regions, it is not ideally suited to study the physiological impact of capillary flow interruptions on surrounding tissue. Ultimately, such in-depth investigations could be made possible through two main strategies, either by increasing the imaging throughput, or by devising a way to trigger such microvascular perfusion losses. The work outlined here focuses on the latter scheme.

Photothrombotic models offer an interesting methodology to perturb the cerebral microvasculature, wherein single arteries or venules can be selectively occluded by photostimulation following the injection of a photothrombotic agent, like Rose Bengal⁸. The excitation of photosensitive agents at a specific illumination wavelength will generate reactive oxygen species (ROS), activate platelets and damage the endothelium, ultimately leading to a clotting cascade.

Such models have been used extensively, to study the impact of a single penetrating arteriole occlusion on somatosensory function⁹, to investigate vascular remodeling post-occlusion^{3,10} and to delineate oxygenation changes caused by such vascular lesions¹¹. An unfortunate shortcoming of this model is the potential secondary occlusions in the surrounding microvasculature caused by the scattering of the laser illumination by tissue¹². As the process relies on single-photon absorption of the photosensitive dye, every vessel illuminated by the excitation beam is susceptible to a thrombotic event. The region of the targeted lesion can therefore be larger than the one defined by the light beam due to scattering. Hence, developing a method answering these limitations is of paramount importance to ensure selectivity of the targeted capillary occlusions.

The advent of multiphoton imaging has provided novel tools for studying and manipulating cortical physiology at high resolution in a depth-resolved manner¹³, enabling imaging and triggering neuronal activity^{14,15}, measuring blood flow velocity¹⁶ and even tissue oxygenation using phosphorescent dyes¹⁷. In contrast to confocal imaging wherein the depth-sectioning is performed by filtering out-of-focus light through a detection pinhole, the multiphoton absorption process naturally confines the excitation axially, limiting significantly any excitation of structures outside of the focal volume. Furthermore, the imaging depth obtainable in multiphoton microscopy is increased compared to its single-photon counterpart, as its illumination is typically in the near-infrared wavelength range and is thus slightly less prone to scattering.

Building on this advantage, Nishimura et al. demonstrated selective occlusions of single vessels in the neocortex by triggering a clotting cascade through non-linear cavitation using ultrafast amplified lasers¹⁸. Using their devised methodology, Shih et al. demonstrated the ability to occlude arterioles and capillaries with high selectivity to study the impact of their blockage on cortical function⁹. Nevertheless, although the proposed method could reliably cause targeted micro-infarcts, its implementation necessitates the addition of high-energy pulsed lasers and the micro-insults often result in irreversible sectioning of the targeted vessel creating micro-bleeds.

In view of these limitations, we propose a novel method for targeted photothrombosis, through multiphoton excitation of a well established photothrombotic agent. The strategy we devised here employs a Ti:Sapphire femtosecond laser, ubiquitous in any neuroscience laboratory comprising a two-photon microscope. We developed a method of selected capillary stroke that could be used to disrupt a vascular architecture and shed light on their contributions to alterations in local flow, oxygenation or local inflammation. Overall, we demonstrate that by stimulating Rose Bengal using femtosecond pulses at 1000 nm for less than 5 minutes, we could create transient targeted microvascular occlusions or reversible blockage, up to a depth of $\sim 250 \mu\text{m}$ in the cortex during 4 hours or more.

4.2 Material and Methods

4.2.1 Animal groups

The Animal Research Ethics Committee of the Montreal Heart Institute approved all procedures described here, in accordance with the Canadian Council on Animal Care recommendations and the protocol for this study was accepted under the ID 2020-2496. We applied the recommendation of the ARRIVE guidelines during this study. Mice underwent a diet of TEKLAD Global 19% protein extruded rodent diet (Envigo) and were under a light/dark cycle of 12 hours each. Clean drinkable water was at all times available. A total of $n=16$ mice were used in this work. We used $n = 7$ C57BL/6 J mice (5 males and 2 females, 3 to 6 months old) kept in separate cages. Although the study involved a Rose Bengal and a control FitC group, the same mice were used for both

groups, but were imaged on different days and in different cortical areas. Two distinct regions were randomly selected on the surface of each mouse's cranial window, for a control session with the FitC and the Rose Bengal trial (see cranial surgery section for procedure). Several days separated the control and the Rose Bengal trial (minimum of 3 days). The control experiment, involving a tail-vein injection of FitC (50mg/mL in saline, volume of 7uL/g body weight, Sigma-aldrich) was performed, followed by selection and excitation of capillaries up to 250 um deep under the pia (see section Multiphoton photothrombosis imaging sessions). Two days later, the mouse underwent an intraperitoneal injection of Rose Bengal (15mg/ml in saline, volume of 7uL/g body weight, Sigma-aldrich) and photothrombosis insults were induced by performing the excitation protocol in the selected region. These groups were designed to verify that photo-ablation was not the mechanism leading to the observed insults and to assess the variability of insult type (blockage, hemorrhage or extravasation). A subset of 2 mice were monitored before the insult, post insult and 24 hours after. An additional group of n=3 mice were monitored before the insult, after the insult, 2 hours, 4 hours and 24 hours following the insult to gather data on the length of blockage from this methodology. An additional 6 mice were used under the same imaging conditions to undergo brain histology and were separated in 2 groups (n=3 4h post insult and n=3 24h post insults)(see Histology). At all times, P.D-M., P.J.M and F.L. were aware of the mice's location and experiment days.

4.2.2 Cranial surgery

To allow imaging of the cortex, a conventional craniotomy was performed on the mice up to ten days before imaging. The craniotomy protocol used in this work was identical as described in Lu et al²¹. Throughout the surgery, a platform (LabeoTech, Canada) monitored the temperature via a rectal thermometer, respiration rate and heart rate via electrocardiogram. Ketoprofen (5 mg/Kg, Merial, Canada) and buprenorphine (0.05 mg/Kg, Reckitt Benckiser Healthcare, UK) were injected before the surgery for analgesic purpose. Under anesthesia (2% isoflurane in oxygen), the scalp was removed, and the skull was cleaned to remove left-over conjunctive tissue. A small area of the skull was thereafter removed with a microdrill. Dental cement was then used to fix the window onto the exposed area. A titanium bar was glued onto the head to serve as an anchor point to maintain the mouse brain fixed during the imaging sessions. Baytril (5 mg/Kg, Bayer, Germany) was injected after surgery. Doses were repeated 24h after and supplemental buprenorphine was used if signs of pain were manifested by the animal up to 24h after the surgery. Annexed to the

imaging system, a custom wheel and fixation fork was utilized to maintain the mice's head fixed with the titanium cranial bar. To reduce stress, since the animals were imaged awake, training through a gradual increase of head-fixation time on the wheel was performed over 4 days from 10 minutes to 45 min (after 3 days of recovery post-surgery).

4.2.3 Multiphoton photothrombosis imaging sessions

For the imaging procedure, the mice were placed on a head-fixation stage and put under the microscope for a maximum duration of 2 hours (Fig. 4.1A). Imaging sessions consisted of 2D multiphoton acquisitions to detect potential target capillaries in one of the selected regions at 100 μm of depth and up to 250 μm below the pia. The power of the laser after the 25x objective was around 87 mW at 1000 nm. No additional dyes were used during the imaging sessions since multiphoton excitation of Rose Bengal yields fluorescence signals at such wavelengths. To ensure maximal power at the focal point, we avoided capillaries lying underneath large cortical vascular structures (veins and arteries). After selecting the target capillary, line scans were performed approximately 15 μm along the vessel's axis at 800 Hz to excite the Rose Bengal. The status of the insults was monitored by observing the intensity of the plasma and the passage of RBCs. 2P excitation of Rose Bengal was done until blood flow interruption was observed in the targeted vessel, 2P line scans data were recorded for an additional 15 seconds or more to ensure blood flow cessation. An additional verification scan was done up to 5 minutes after the insult. If both measures confirmed a blocked vessel, we treated the vessel as blocked.

4.2.4 Histology

We performed histological analysis on the cortical region of interest where up to 15 insults were performed in an area of 1mm x 1mm. Animals were anesthetized four hours or 24 hours following the imaging session with 2% isoflurane and received intracardiac 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 0.3mL/min. The brains were then extracted and placed in a 4% PFA solution during 24h. Following a dehydration process and an embedding in paraffin, the brain was cut in 6 μm thick slices to undergo histological marking of neutrophils, VCAM-1, platelets (CD41), E-selectin (CD62) and neutrophils (Ly6G) (see supplementary methods).

4.2.5 Exclusion criterion

After cranial surgery, the experiment with a particular mouse was interrupted if signs of pain were to remain past 24h of recovery. No full 2P excitation line scans were excluded but the criteria for exclusion was bad signal from the 2P line scans that could come from an optical system misalignment, dye injection failure or observation of cortical inflammation, dura growth and RBC speed/flux data arising from erroneous data due to movements artifacts. The first 10 mice were considered for the analysis of the Rose Bengal excitation, insults and correlation (Fig. 4.1F-H and 2A). Additional criteria for exclusion during analysis were low quality optical coherence microscopy angiography (OCMA, see supp. methods) imaging from which 2 samples were excluded. As for the analysis of blockage dynamics shown in Fig. 4.2B and 2D, a subset of $n = 2$ mice across 5 imaging sessions were used with the exclusion of two imaging sessions due to artifacts. An additional experiment monitoring the blockages of the insulted vessels with $n = 4$ mice was conducted for figure 4.2C. One mouse of this group was excluded due to issues in the integrity of the craniotomy and a single imaging session was performed for each of the 3 other mice. In the immunofluorescence trials, 2 mice of each group had to be excluded since planning of these experiments required practice trials.

4.3 Results

4.3.1 Multiphoton excitation of Rose Bengal for photothrombosis

Prior to inducing insults *in vivo*, we characterized the multiphoton excitation properties of Rose Bengal. We measured the relationship between the input illumination power at 1000 nm and the fluorescence emission of the Rose Bengal at 580 nm. We filled an optical chamber with Rose Bengal and measured the output fluorescence with a photomultiplier tube (PMT) under increasing excitation powers. Figure 4.1B shows the polynomial response of the emitted fluorescence under two photon (2P) excitation. The slope of the fluorescence in a log-log plot has a value of 2.09 suggesting a 2P excitation process. The maximal power output measured at the front focal plane of the microscope

Prior to inducing insults *in vivo*, we characterized the multiphoton excitation properties of Rose Bengal. We measured the relationship between the input illumination power at 1000 nm and the fluorescence emission of the Rose Bengal at 580 nm. We filled an optical chamber with Rose Bengal and measured the output fluorescence with a photomultiplier tube (PMT) under

increasing excitation powers. Figure 4.1B shows the polynomial response of the emitted fluorescence under two photon (2P) excitation. The slope of the fluorescence in a log-log plot has a value of 2.09 suggesting a 2P excitation process. The maximal power output measured at the front focal plane of the microscope objective was ~87 mW. Secondly, we computed the cross-section of Rose Bengal using the method delineated by Xu et al.²⁷, by varying the laser's emission wavelength from 850 nm to 1040 nm. As can be observed in Fig. 4.1C, the obtained cross section variations across the laser's spectral range indicate the presence of excitation wavelength candidates. We chose to excite the photosensitive dye at 1000 nm since the power of our laser source was higher compared to 1040 nm. The cross section measured at 1000 nm for Rose Bengal was $(3 \pm 0.3) \times 10^{-60}$ m⁴s/photons compared to Fluorescein isothiocyanate (FitC) at 1000 nm which is around 8×10^{-58} m⁴s/photons representing a 100-fold reduction²⁷. These results highlight the potential for multiphoton fluorescence excitation of Rose Bengal at 1000 nm. We then sought to verify the photothrombotic capabilities of the non-linear excitation of Rose Bengal. We thus performed line scans along the longitudinal axis of capillary blood vessels in vivo, enabling both the measurement of hemodynamic parameters (RBC speed and flux) and the activation of Rose Bengal, as shown in Fig. 4.1D. With the same agent, the highlighted timetrace presents the variability in RBC flux and RBC speed observed during the excitation process in the 2P imaging setup. As is shown in the section of the timetrace labeled "1", we provide a timetrace representative of the initial RBC flow in the targeted vascular structure. In the time trace labeled "2", we observed intermittent stalling events during the excitation protocol, followed by a recovery of the initial RBC flux and speed. Lastly, as is shown in the timetrace labeled "3", we observed a persistent blockage, characterized by an absence of RBC lasting 15 seconds or more. As mentioned above, isolated blood flow cessation events were observed before a total RBC flow cessation. For this reason, we set a minimal time of 15 seconds of continuous blockage absence of RBC to consider the vessel blocked via the Rose Bengal excitation. The example shown in Fig. 4.1D and supplementary video 1 also represents a typical blood flow cessation observed with the multiphoton signal from the Rose Bengal fluorescence. In summary, Rose Bengal is a 2P fluorescent dye which can be used as a monitoring tool and photothrombotic agent. The maximal power output measured at the front focal plane of the microscope objective was ~87 mW. Secondly, we computed the cross-section of Rose Bengal using the method delineated by Xu et al.²⁷, by varying the laser's emission wavelength from 850 nm to 1040 nm. As can be observed in Fig. 4.1C, the obtained cross section variations across the laser's spectral range indicate the presence of excitation wavelength

candidates. We chose to excite the photosensitive dye at 1000 nm since the power of our laser source was higher compared to 1040 nm. The cross section measured at 1000 nm for Rose Bengal was $(3 \pm 0.3) \times 10^{-60}$ m⁴s/photons compared to Fluorescein isothiocyanate (FitC) at 1000 nm which is around 8×10^{-58} m⁴s/photons representing a 100-fold reduction²⁷. These results highlight the potential for multiphoton fluorescence excitation of Rose Bengal at 1000 nm. We then sought to verify the photothrombotic capabilities of the non-linear excitation of Rose Bengal. We thus performed line scans along the longitudinal axis of capillary blood vessels *in vivo*, enabling both the measurement of hemodynamic parameters (RBC speed and flux) and the activation of Rose Bengal, as shown in Fig. 4.1D. With the same agent, the highlighted timetrace presents the variability in RBC flux and RBC speed observed during the excitation process in the 2P imaging setup. As is shown in the section of the timetrace labeled "1", we provide a timetrace representative of the initial RBC flow in the targeted vascular structure. In the time trace labeled "2", we observed intermittent stalling events during the excitation protocol, followed by a recovery of the initial RBC flux and speed. Lastly, as is shown in the timetrace labeled "3", we observed a persistent blockage, characterized by an absence of RBC lasting 15 seconds or more. As mentioned above, isolated blood flow cessation events were observed before a total RBC flow cessation. For this reason, we set a minimal time of 15 seconds of continuous blockage absence of RBC to consider the vessel blocked via the Rose Bengal excitation. The example shown in Fig. 4.1D and supplementary video 1 also represents a typical blood flow cessation observed with the multiphoton signal from the Rose Bengal fluorescence. In summary, Rose Bengal is a 2P fluorescent dye which can be used as a monitoring tool and photothrombotic agent.

4.3.2 Insults etiology

As detailed in Nishimura et al, the different flow behaviors or insults seen in line scans and in two-dimensional acquisitions could be explained by distinct mechanisms, such as a blood clot formation, extravasation or explosion of the vessel (bleed). Throughout our targeted photothrombosis experiments, we also observed these three types of vascular insults.

The most common observation consisted in a blood flow interruption causing little or no spill of the imaging dye in the extracellular space, as shown in Fig. 4.1E. Alternatively, in some cases the excitation process could lead to a rupture of the vascular wall resulting in a spill of the imaging dye in the neuropil. Lastly, we also observed blood flow cessation events followed closely by an

inflation of the vessel until rupture of the vascular wall. The two latter observations were labeled as hemorrhages since these insults were not in the scope of the study.

To discard the possibility that the thrombi made in this experiment were induced by laser damage, we compared the ratio of occlusions between a control group injected with FitC and another with Rose Bengal at similar power levels. The results of these experiments are shown in the Fig. 4.1F-4.1G. We show the total amount of trials and the respective occurrences of blood flow interruption for both blockage and hemorrhages (Fig. 4.1F and 1G respectively). As is highlighted in Fig. 4.1F, the ratio of blockage formation over 95 trials (60%) is almost five-time higher for the Rose Bengal excitation than with FitC (12 blockages in 82 trials (14%)). This result strongly suggests that Rose Bengal played a role in the blockage mechanism. Conversely, the hemorrhage ratio was similar between both groups, as is shown in Fig. 4.1G.

We additionally investigated the average excitation time necessary for blockages to occur, and obtained 295 ± 270 seconds, 290 ± 173 s and 317 ± 226 s for depths of $100\mu\text{m}$, $150\mu\text{m}$ and $200\mu\text{m}$ below the pia respectively.

To assess the performance of the Rose Bengal multiphoton excitation, we devised a proportion z test defining the blood flow interruption without hemorrhage as a binary positive value and the rest of observations as a null value. This test gave a p-value of 10^{-9} showing a quantitative rejection of the null hypothesis between the FitC injection group and the Rose Bengal injection group. The null hypothesis cannot be discarded for the hemorrhage ratio, as both groups exhibit a similar rate of this kind of vascular insult.

4.3.3 Speed-flux correlation conservation

With the photothrombotic protocol in place, we sought to investigate the hemodynamic changes occurring during excitation. Figure 4.1H presents the RBC flux and speed timetraces for four vessels throughout the photo-excitation. RBC speed profiles from the 2P line scans were analyzed and artifacts induced by sample motion were dismissed in the computing of speed and flux (see methods)²². As can be seen in the individual panels, despite some erroneous data in the speed profile, RBC hemodynamics correlate until the blockage is observed. This correlation is

highlighted in the scatter plots placed below each individual hemodynamic timetrace. Interestingly, although the RBC flux and speed are both reduced during the excitation, their linear dependency remains even for low values. During the excitation of Rose Bengal, no clear trend of RBC flux and speed reduction is apparent from the excitation initiation (Fig. 4.1H1- 4.1H3), except for some cases such as the second timetrace in Fig. 4.1H4 where a clear descending slope is observed.

4.3.4 Multimodal imaging of capillary events

As demonstrated previously, through multiphoton excitation, Rose Bengal can be used both as an imaging dye and as a photothrombotic agent. Although this behavior allows concurrent hemodynamic monitoring and photothrombotic stimulation, as was shown above, it also restricts the imaging conditions. In order to assess the perfusion status of the surrounding vasculature without triggering the thrombotic agent, we therefore imaged the angioarchitecture using the OCMA modality of our imaging platform. As OCM is a label-free imaging technique operating at 1300 nm, it ensured no interference with the multiphoton detection and no activation of the dye. Furthermore, the OCMA path having its own independent scan unit enabled imaging a different region than the one interrogated by the multiphoton path. Figure 4.1E highlights two examples of blockage observed in 2P and OCMA. The red line in the 2P image shows the line over which the line scan protocol was performed. As can be observed in these 2P angiograms, the 2P's optical sectioning is extremely narrow and thus fails to provide a confirmation of blood flow cessation, as an axial displacement artifact could render the same effect. However, OCMA is an imaging modality which has a greater depth of field and is able to provide so-called perfusion maps wherein static structures and dynamic ones can be differentiated by high pass temporal filtering²⁷. If a vessel is irrigated, it will appear as a bright feature in the angiogram. Conversely, if the vessel is blocked, no RBCs will flow through it and the structure will be indistinguishable from the static background. As seen in the corresponding OCMA acquisition in Fig. 4.1E, one can distinguish the similarities of observable structures during the irrigation of the vessels between the two modalities. Then, the blockage of the targeted capillary is assessed through the vanishing of the vessel in OCMA.

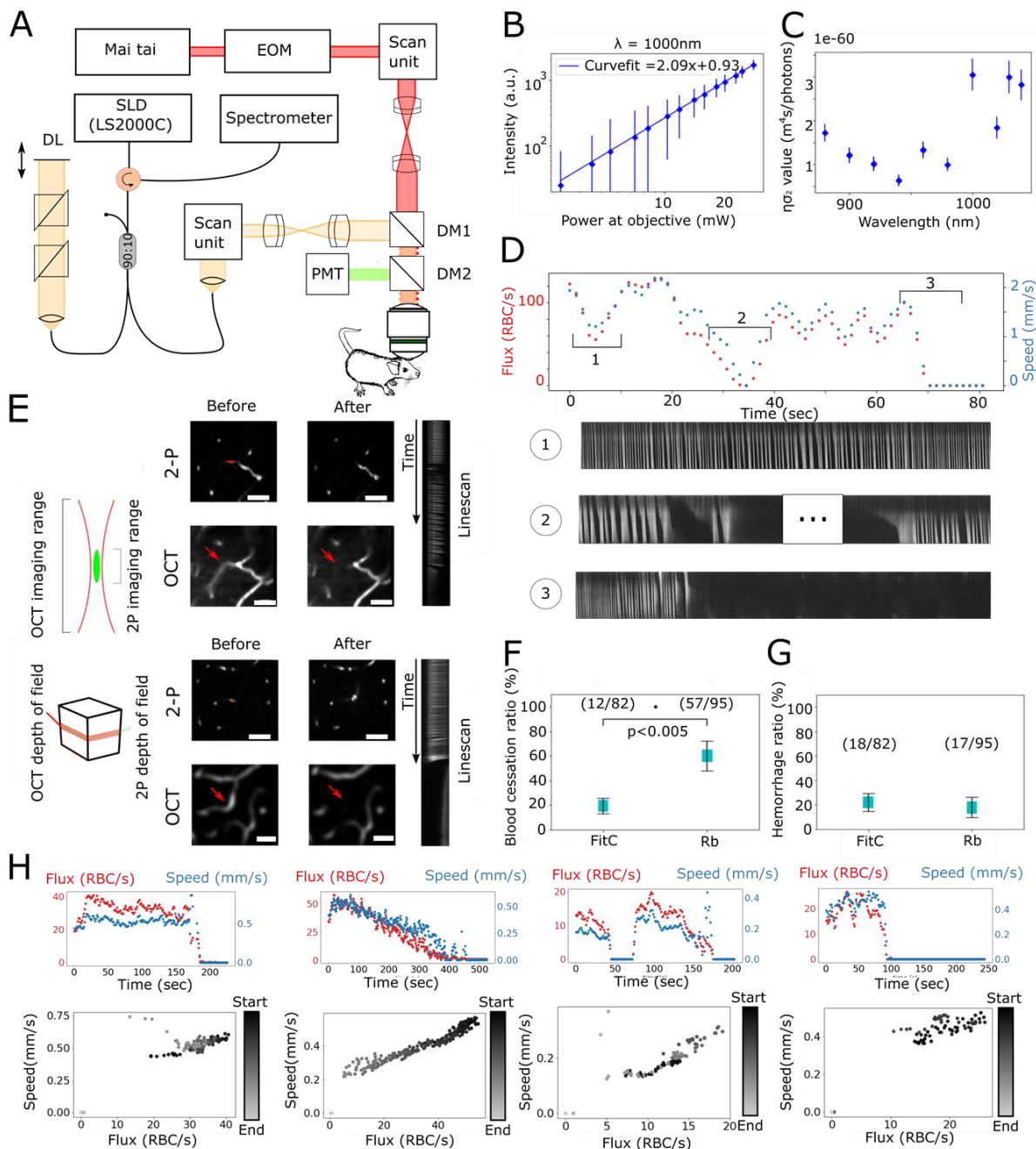


Figure 4.1 : Overall view of the imaging system (A). EOM : Electro-optical modulator, PMT : photo-multiplier tube, DM1 and DM2 : Dichroic Mirrors (Longpass), DL : optical Delay Line. Log-log plot of 2P excitation signal from Rose Bengal dye exhibiting a slope of 2.09 (B) and the cross section of the Rose Bengal (C). Using the cross section data, one can see a peak cross section value at 1000 nm used in this study. Typical demonstration of a blockage session (D). The longer depth of field in OCMA provides more spatial information with an angiogram protocol and the

respective blockage events are shown in the line scans (E). Scales bars are 100 μ m, red arrows show blood flow cessation in targeted vessels and red line is site of Rose Bengal excitation. Reckoning of blockages and hemorrhage incidence rates (F-G). RBC flux and speed during Rose bengal excitation formation sessions with their respective correlation plot (H).

4.3.5 Insults dynamics

To investigate the temporal characteristics of the insult by imaging before and after multiphoton thrombosis, we used OCMA acquisitions as a means of qualitatively characterizing the hemodynamic status of targeted capillaries (i.e. the irrigation of the vessel and its surrounding) similarly to Srinivasan et al.²⁷. Figure 4.2A shows three different acquisitions with this imaging scheme. To assess the perfusion state inside the targeted vessel, the intensity of the vascular structure in the perfusion map is normalized to the local background. The right panels present timetraces of the vessel's brightness segmented by a yellow region normalized to the background in the respective green region. In these plots, OCMA timetraces manifest either a higher intensity compared to the baseline timetrace (erythrocytes are passing through the vessel), similar intensity as the background (representing a total blockage) or both (corresponding to intermittent stalling events). The first and second acquisition show a significant change in the irrigation of the targeted vessels post-insult. These results corroborate the RBC flow cessation in the 2P timetraces. The third plot of Fig. 4.2A, shows a pre-insult stalling event highlighted with a blue curly brace. This vessel then exhibits a rapid unblocking after the insult (around 35 seconds as pointed out by a red arrow). The vessel, therefore, experienced a flow interruption before and during the 2P line scan excitation, but regained irrigation once the excitation was halted. These observations corroborate the targeted multiphoton thrombosis done via the 2P optical path and enable the monitoring of insulted vessels without undesired activation of the thrombi agent.

4.3.6 Insult duration

The rapid recovery post-insult observed in the Fig. 4.2A raises questions regarding the duration of the photo-induced capillary flow cessation. In order to characterize the durability of the insult caused by the presented protocol, we thus tracked and imaged targeted vessels using the OCMA imaging path before and immediately after the blood flow cessation, 2 hours, 4 hours and 24 hours later. Figures 4.2B and 4.2C show the OCMA resulting from this sequence of acquisitions.

Immediately following the protocol, the downstream vessel's intensity captured in OCMA shows a blood flow cessation (the vessel is indistinguishable from the background).

The imaging sessions performed 2 and 4 hours post thrombosis highlight a persistent blockage of the targeted vessel as shown in the stallograms. However, 24 hours after the insult, most tracked vessels appear once again in OCMA (n=15 observations) but don't necessarily exhibit more events of stallings, demonstrating that the protocol produces under 24 hours blockages rather than creating vessels exhibiting stalling events.

4.3.7 Targeted photo-occlusions leads to larger distances between vessels

During the occlusion, nutrient delivery may be impaired in the vicinity of the targeted vessel. In an attempt to shed light on the effect of the blood flow cessations induced by our protocol, we computed the distances from the nearest vessel before and after targeted photo-thrombosis. Once again, we selected OCMA as a means of obtaining a 3D angiogram to prevent any undesired photo-excitation of the vascular arbor during imaging. The 3D OCM angiograms were then processed through various steps (see methods) to obtain an estimation of the distance between each point in tissue to its nearest vessel, so called *distance map*. Fig. 4.2D presents OCM angiograms obtained before and after photo-thrombosis and their corresponding distance maps, for two distinct vessels. A distinct difference can be observed in the distance maps of the angiograms before and after photo-occlusion, as is pointed out by the arrows in Fig. 4.2D. We attempted to quantify these observations by comparing the histograms of the distance maps before and after the insult. Care was taken to precisely superimpose both angiograms prior to obtaining the histogram. A shift in the histogram can be observed in Fig. 4.2D, confirming our initial claim that the photo-thrombosis leads to slightly longer distances between vessels. These longer gaps could potentially lead to nutrients delivery impairments and may cause harm to cellular bodies in the neuropil where longer distances from a vessel are observed.

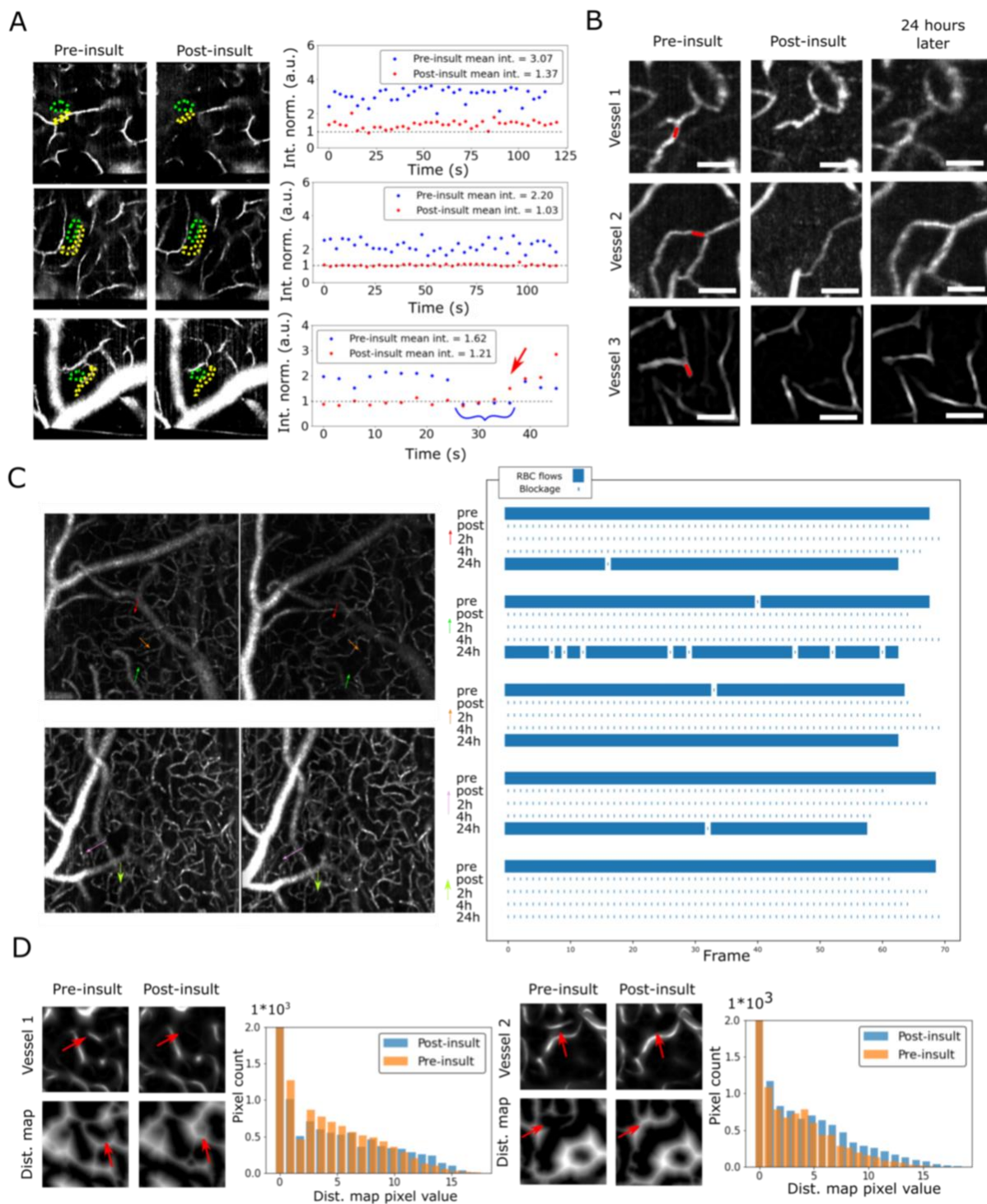


Figure 4.2 : Examples of different blood flow dynamics in different capillaries via OCMA (A). The green region represents the background used for normalization of the signal shown in the yellow region. Three recurrent observations are presented: RBC flux reduction, RBC flux cessation or

rapid recovering of the RBC flux. The baseline intensity of 1 is represented by the gray dotted line for visual assessment. Persistence of the insult can be assessed with temporal imaging and 24 hours reevaluation (B). Showing examples of 3 vessels, OCMA intensity vanishing shows the RBC flux cessation in the vessel. The red line shows the 2P line scan excitation localization and the scale bar is 100um. After 24 hours, the targeted vessel recovers its RBC flux. Targeted vessels seem to exhibit a total flow blockage up to 4 hours post thrombosis (C). But, the recovered flow may not exhibit the same hemodynamics following the insult. Colored arrows point to the targeted vessel in the angiogram field of view. During an insult, nearest distance from a vessel is lengthened (D). 2 vessel blockages are shown with their impact on the distance histogram and red arrows point to the targeted capillary. Followed by image processing to show the distance from the nearest vessel, higher values in the histogram are promoted, showing potential for impaired nutrient delivery. Peripheral vessels may not be affected by the insults inflicted via the resilience of the vascular system (D). Vessels labelled yellow are peripheral to the targeted red one and the red dotted line is the excitation line scan path (left). Despite changes in the signal, peripheral vessels exhibit OCMA signals even after the insult took place (right).

4.3.8 Histological markers

An immunohistology investigation 4 hours and 24 hours following the insults was performed to elucidate the different processes occurring around the area of vascular blockage. The results shown in Fig. 4.3A-E shows VCAM expression around the site where multiple capillaries were blocked (see Supp. Methods). Moreover, Ly6-G labeling shows a recruitment of monocytes/ granulocytes/ neutrophils in the center of the injured area. Some superpositions of Ly6G expression and VCAM/platelets are observable in the fixed tissue which are highlighted by yellow arrows. After 24h, Fig 4.3G-H shows no presence of platelets, no E-selectin expression or neutrophils. However, appearance of cicatricial tissue and VCAM expression in some vessels can be observed in the area where insults were performed.

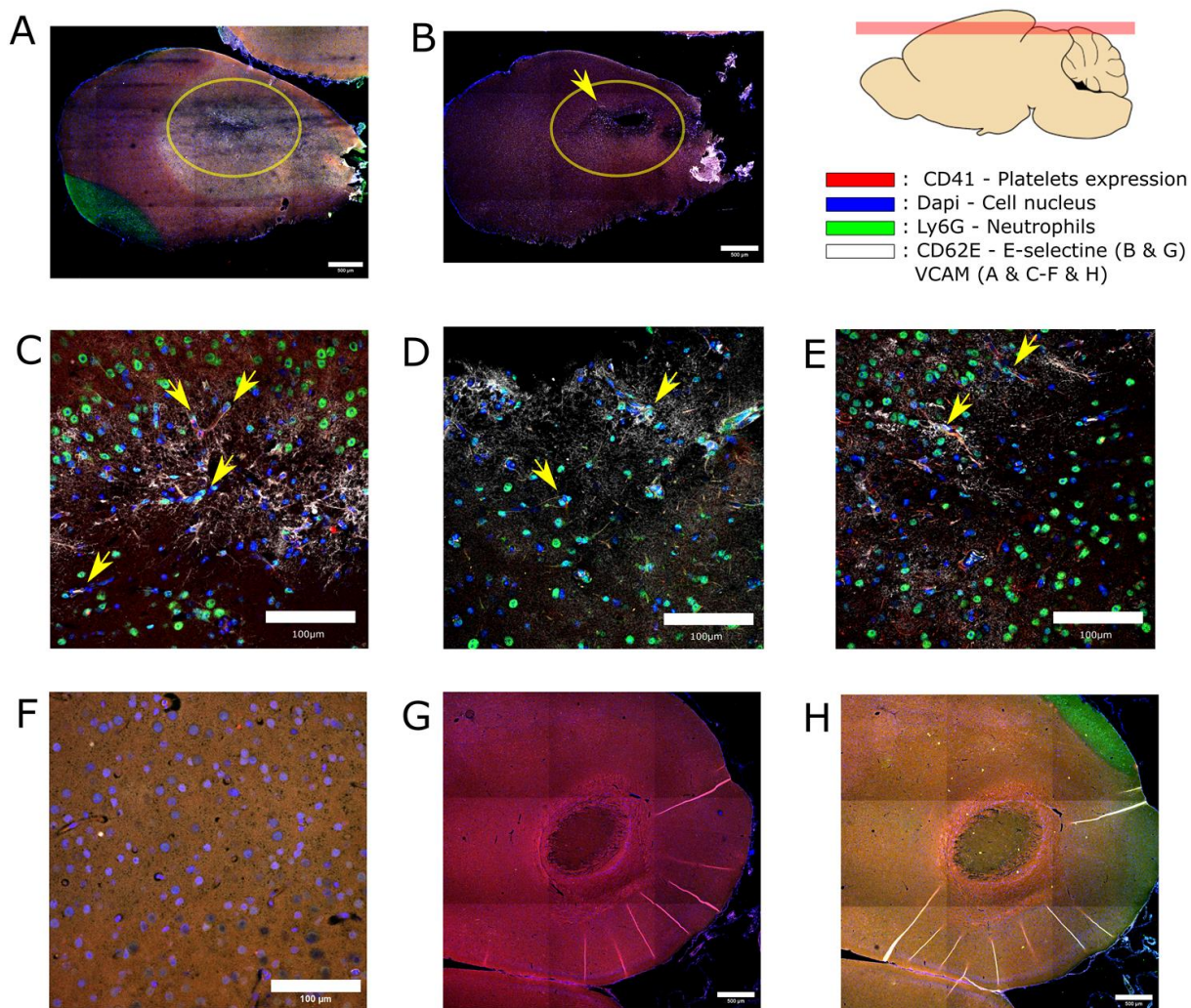


Figure 4.3 : Immunofluorescence from 4 protein expressions is performed and shown to investigate the mechanism of the insults performed. DAPI was used to color the cell's nucleus in blue. The area of multiple capillary blockages is pointed out by a yellow circle where the labeling seems to be uniform throughout the region for a 4 hour brain post manipulations (A). Some 40x magnifications are shown (C-F). Yellow arrows highlight some points where expression of Ly6G(green), VCAM(white) and CD41(red) are visible and superimposed pointing towards a mechanism involving the neutrophil as a driver of the capillary blockage. CD41 expression tends to show disseminated platelets in the vessels which can be explained by stalled blood during the sacrifice. An example of healthy tissue is shown (F). Labeling on the image (B) shows little to no expression of CD41(red) and some expression of CD62E(white) in the morphologically changed area indicating inflammation at the vascular endothelium level. 24 hours after the insults(G-H),

cicatricial tissue seems to appear in the center of the targeted region also pointing towards cellular death post oxygen deprivation. No expression of CD41(red (G-H)),CD62E(white (G)), Ly6G (green(H)) or VCAM(white(H)) are observed to be qualitatively different from healthy tissue.

4.4 Discussion

4.4.1 Dye characterisation

We presented a novel way of manipulating the hemodynamic properties of targeted microvessels using a well established dye and off-the-shelf optical elements. We demonstrated the possibility of interrupting RBC flow in targeted vessels using a simple line scan protocol combined with multiphoton excitation of Rose Bengal. The characterized cross section at 1000 nm of this reagent (3×10^{-60} m⁴/photons) is around 100 times lower than FitC's cross section (8×10^{-58} m⁴/photons) for the same wavelength. Nonetheless, since FitC is a potent imaging dye in biological studies, a 100 fold difference in cross section is still usable in a well designed and optically isolated 2P microscopy setup as shown in our results. Our proposed methodology using a simple line scan protocol enabled blocking capillaries with a success rate of 60%, compared to 14% in a control group injected with FitC for the same optical power of ~87mW. Therefore, this change in occlusion rates and multiphoton response of the Rose Bengal are indicators that oxidative stress via ROS creation is likely the mechanism underlying the flow interruptions observed.

4.4.2 RBC speed flux correlation and transient behavior

In contrast to the traditional green light illumination of Rose Bengal, our proposed multiphoton excitation of the photothrombotic agent does not seem to create permanent blockage of the targeted microvessels. In our experiments, we observed persistent blockages after the insult, 2 hours, 4 hours following a confirmed insult and a recovery of irrigation after 24h (See supplementary video 2). Although more work is necessary to understand the root cause of this transient behavior, one candidate could be the RBC dynamics inside the vessel. With green light excitation, pial vessels are usually targeted to create larger clots via platelets activation and RBC assembly and ultimately blood flow cessation in downstream structures through lodging of these clots or local aggregation. Capillaries might not provide an environment as auspicious to the traditional blood clot formation mechanism since RBC flows discretely in such vessels. Moreover, during the excitation of the Rose Bengal, correlation of RBC speed and flux seems to be conserved until the complete blockage. The

inflammation caused by our protocol via ROS or heat deposition is not a tool we can use to disrupt the vessel enough to change the properties that constrain this correlation. Overall, the presented model might provide an avenue towards generating controlled insults via local inflammation creation.

4.4.3 Insults mechanism

Through multiphoton excitation of Rose Bengal, we demonstrated here the possibility to perturb flow in a single microvessel optically. Nevertheless, the underlying mechanism linking the photostimulation remains to be investigated. In our trials, we observed that FitC excitation could cause vessel damages via hemorrhage, extravasation and blood flow cessation. Three hypotheses for these injury processes are FitC photo-saturation, laser damage via micro cavitation or heat deposition. To discard the micro cavitation hypothesis, it is important to consider the fluency of the laser at the imaging plane. Since the 2P source does not provide a fluency around the threshold of ablation of 1 J/cm^2 in biological tissue¹⁸, creation of a microcavitation bubble causing physical injury is implausible. For reference, computation of fluency with our setup provides a value around 0.1 J/cm^2 , 10x lower than the threshold level. With respect to the photo-saturation hypothesis, we suspect the saturation of the FitC dye plays a role as a phototoxicity reagent²⁹ causing damage to the vascular walls similar to the mechanism seen with Rose Bengal. As Fig. 4.1F-G suggests, the rate difference between the type of insults in Rose Bengal and FitC could be primarily explained by the efficacy of each probe to create reactive oxygen species. We cannot discard at this stage the contribution of heat deposition as a mechanism causing capillary injuries. Since blood flow cessation is more prominent in the Rose Bengal group, reactive oxygen species from this reagent and heat deposition are highly likely to play a main role in the insults created. Histological observations 4 hours after the injuries show a clear inflammatory response by the VCAM expression in tissue with an absence of agglomerates of platelets via the CD41 expression. Some CD41 expression is still observed, however this might be due to clogged vessels in the sacrificial process leaving disseminated platelets in the vessels. This observation tends to show that blocked vessels have experienced inflammatory processes without rupture or extravasation. As displayed in Fig. 4.3, a superposition of Ly6G expression with VCAM/platelets can be observed in vessels expressing inflammatory damage. These spatially close expressions are evidence pointing towards a mechanism of neutrophil plugging as described in *Hernandez et al.* Moreover, E-selectin

(CD62E) expression is observed in the vicinity of such insults, also demonstrating a trend towards an inflammation route at the vascular endothelium level. In the 24 hours post insults group, most inflammation seem to recede in the targeted area but limited VCAM expression is still present at region's periphery. No other notable expressions of Ly6G, CD62E, CD41 are observed. However, the tissue seems to undergo a morphological change observable by DAPI labeling where fibrous structures seem to fill the area of insult which could be cicatricial tissue. This change in appearance can also be attributed to a rapid increase of ischemic cell deaths in the targeted area. Which would represent a penumbra in the cortical tissue caused by the multiple capillaries targeted in a roughly 1 mm square area. These observations and analysis point towards the activation of Rose Bengal and ROS creation as main drivers of inflammation leading to a blockage assisted by neutrophil adhesion at the vascular wall.

4.4.4 Advantages of multiphoton photothrombosis

The primary result of this work is the excitation of Rose Bengal in a multiphoton setting. Although shifting to such a multiphoton scheme may reduce the efficiency of ROS creation, mainly due to the reduction in the probe's cross-section, it provides precious additional advantages. The targeting depth is increased in our configuration due to the increase in excitation wavelength, as near-infrared light is less susceptible to scattering in biological tissue. Additionally, the multiphoton process enables precise spatial targeting of vessels in the axial dimension, thus mitigating any residual illumination outside of the targeted area. Although protocols are being tailored to minimize secondary occlusions caused by scattering¹², single-photon excitation cannot provide the level of specificity demonstrated in our work. An intrinsic advantage from the multiphoton excitation of Rose Bengal comes from the fluorescence emitted during the line scans protocol ensuring precise localization of the photothrombosis effect. Our approach can be easily implemented in any multiphoton imaging system, and can therefore be complemented with other imaging dyes, enabling concurrent imaging of neuronal and oxygenation dynamics during the blockages.

4.4.5 Limitations

This work presents the possibility of Rose Bengal usage for multiphoton targeted insults, but aspects concerning the characterization of the vascular topology and inflammation process remain obscure and are a limitation to the present study. No *in vitro* monitoring of the Rose Bengal ROS

generated during 2P excitation was performed. We assumed that the same molecular pathways of the Rose Bengal molecule were activated in the creation of ROS. We suspect that multiphoton excitation may be less efficient regarding this aspect, but no result presented in this paper could prove such a claim. During our trials, we could not characterize the order of the vessel, but considered discrete RBC passage as a qualitative condition to identify the vessel as a capillary. Since the order of the vessel may influence the diffusion of generated ROS in the flowing blood and other hemodynamic parameters, this variable could have explained the high variance we observe in the time of excitation before blockage. Despite efforts to clarify the origin of OCMA signal, its relation to RBC flux and speed are unknown. Therefore, we used OCMA as a qualitative signal indicator of RBC passage. Since we cannot provide quantitative hemodynamics with OCMA, we could not corroborate RBC flux and speed values from our 2P acquired data. Additionally, the animals used in this study were all young mice, which can cause a bias over the observations. Since young mice are more susceptible to recover from such vascular insults as opposed to Alzheimer disease mice models or older mice. A supplementary limitation resides in the design of the FitC/ Rose Bengal comparison groups. Since the FitC sessions were performed before the Rose Bengal group, we cannot completely discard the impact of the previous imaging session on the second. However, FitC being rapidly cleared from the system, the minimal waiting time of 3 days between imaging sessions and the fact that different cortical regions were used, we believe that residual inflammation that could have been caused by previous sessions were negligible.

4.4.6 Future experiments

Possible uses of this technique could reside in the creation of subcortical insults near the white matter. Since clinical microinfarcts are observed throughout the cortical layers and the white matter in dementia, this technique could be a useful tool to perform photothrombosis near the cerebral white matter to corroborate observation of oxygen deprivation in these regions. Enhancing the attainable depth would be crucial for the method since depth is still a problematic factor in the time of excitation. Using sophisticated optical techniques, surgical manipulations or other photothrombotic agents with a multiphoton pathway could prove beneficial to increase the depth of targeted insults.

The limited duration of the insults (under 24h) could prove beneficial in understanding and observing stalling events as well as recovery from nearby tissue. This model could provide a way to control stalling since such events are hard to study given their scarcity. With proper probes such as PO₂ markers, analysis of the recovery of oxygen deprivation in controlled *in vivo* experiments and its consequences could help enhance our understanding of nutrients and oxygen diffusion at the capillary level.

A final application of this technique could exploit such control over the flow of one capillary branch combined with analysis of concurrent Doppler OCM to obtain a bigger picture from the impact of a single microvessel blockage and, at the same time, assessing the implications of peripheral vessels and changes in the vicinity of the target zone providing a framework for an *in vivo* corroboration of simulation *in silico* as presented in Schmid et al. ⁷

4.5 Conclusion

In this work, we demonstrate a novel way to use an off the shelf photothrombosis reagent via a multiphotonic activation pathway. Advantages of this technique rely on the longer wavelength used for the excitation, providing an opportunity for deeper cortical insults; the spatial confinement of the excitation volume which limit the activation of Rose Bengal and ensure a targeted single capillary occlusion and the disponibility of tools required that are ubiquitous to neuroscience labs. This protocol enables targeted inflammation driven capillary stalls as seen in neuropathologies characterized by neutrophils adhering to the vascular wall through VCAM/CD62E expression. Future work will focus on nutrient distribution and reach of influence of such insults.

4.5.1 Acknowledgement

P.J.M. acknowledges that part of his contribution was undertaken by funding from the Canada First Research Excellence Fund through the TransMedTech Institute and from the Swiss National Science Foundation. This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada and a Canada Research Chair to F. Lesage.

4.5.2 Author contribution statement

P.D-M. and P.J.M. conducted the experiments, X.L. and C.Z. performed the surgeries, P.D-M treated the data for the analysis, P.J.M and F.L. directed the project. R.D. provided the framework for the linescans. All authors reviewed the manuscript.

4.5.3 Disclosure/conflict of interest

F.L. declares partial ownership in Labeo Technologies. No other potential conflicts of interest are declared by the authors and contributors of the project. Due to the considerable storage space imaging data requires (over 600 Go), data is not already accessible on a public repository, but will be shared upon request.

Supplementary material for this paper can be found at :

4.6 Références

1. J. C. Cruz Hernández, O. Bracko, C. J. Kersbergen, *et al.* "Neutrophil adhesion in brain capillaries reduces cortical blood flow and impairs memory function in Alzheimer's disease mouse models," *Nat Neurosci* 22, 413–420 (2019).
2. S. E. Erdener, J. Tang, K. Kılıç, D. Postnov, J. T. Giblin, S. Kura, I. Anderson Chen, T. Vayisoğlu, S. Sakadžić, C. B. Schaffer and D. A. Boas, "A hyperacute role for neutrophils in persistent traffic jams", *J. Cereb. Blood Flow and Metab.* 41(2), 236-252 (2021).
3. Y. Lu, X. Lu, C. Zhang, *et al.* "Longitudinal optical coherence tomography imaging of tissue repair and microvasculature regeneration and function after targeted cerebral ischemia," *J. Biomed. Opt.* 25(4) 046002 (2020).
4. S.E. Erdener, J. Tang, A. Sajjadi, *et al.* "Spatio-temporal dynamics of cerebral capillary segments with stalling red blood cells", *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 39(5), 886–900 (2019).
5. G. Hartung, S. Badr, M. Moeini, *et al.* "Voxelized simulation of cerebral oxygen perfusion elucidates hypoxia in aged mouse cortex", *PLOS Computational Biology* 17(1): e1008584 (2012).

6. X. Lu, M. Moeini, B. Li, *et al.* "Voluntary exercise increases brain tissue oxygenation and spatially homogenizes oxygen delivery in a mouse model of Alzheimer's disease", *Neurobiol. Aging* 88, 11-23, (2020).
7. Schmid F, Conti G, Jenny P, *et al.* The severity of microstrokes depends on local vascular topology and baseline perfusion. *Elife*. May 18;10:e60208 (2021).
8. B.D. Watson, W.D. Dietrich, R. Busto, *et al.* "Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis", *Ann Neurol.*, 17, 497-504 (1985).
9. Y. Shih, P. Blinder, P. S. Tsai, *et al.* "The smallest stroke: Occlusion of one penetrating vessel leads to infarction and a cognitive deficit," *Nat. Neurosci.*, 16(1), 55–63 (2013).
10. B Schaffer, B. Friedman, N. Nishimura, *et al.* "Two-photon imaging of cortical surface microvessels reveals a robust redistribution in blood flow after vascular occlusion," *PLoS Biol.* 4(2), 258–270 (2006).
11. S. M. Shams Kazmi, A. J. Salvaggio, A. D. Estrada, *et al.* "Three-dimensional mapping of oxygen tension in cortical arterioles before and after occlusion," *Biomed. Opt. Express* 4, 1061-1073 (2013).
12. S. Sunil, S. E. Erdener, B. S. Lee, *et al.* "Awake chronic mouse model of targeted pial vessel occlusion via photothrombosis," *Neurophoton.* 7(1) 015005 (2020)
13. K. Svoboda, and Y. Ryohei, "Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience." *Neuron* 50(6), 823-839 (2006).
14. W. Mittmann, D. J. Wallace, U. Czubyko, *et al.* "Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons in vivo" *Nat Neurosci* 14, 1089–1093 (2011).
15. L. Carrillo-Reid, S. Han, W. Yang, *et al.* "Controlling Visually Guided Behavior by Holographic Recalling of Cortical Ensembles", *Cell* 178(2) (2019).
16. Y. Shih, J. D. Driscoll, P. J. Drew, *et al.* "Two-Photon Microscopy as a Tool to Study Blood Flow and Neurovascular Coupling in the Rodent Brain". *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 32(7), 1277–1309 (2012).

17. S. Sakadžić, E. Roussakis, M. Yaseen, *et al.* "Two-photon high-resolution measurement of partial pressure of oxygen in cerebral vasculature and tissue". *Nat. Methods* 7, 755–759 (2010).
18. N. Nishimura, C. B. Schaffer, B. Friedman, *et al.* "Targeted insult to subsurface cortical blood vessels using ultrashort laser pulses: Three models of stroke," *Nat. Methods* 3(2), 99–108 (2006).
19. V. J. Srinivasan, H. Radhakrishnan, J. Y. Jiang, *et al.* "Optical coherence microscopy for deep tissue imaging of the cerebral cortex with intrinsic contrast," *Opt. Express* 20, 2220-2239 (2012).
20. X. Lu, M. Moeini, B. Li, *et al.* "Hypertension accelerates cerebral tissue PO₂ disruption in Alzheimer's disease," *Neurosci. Lett.* 715, 134626 (2020)
21. Drew, P. J., Blinder, P., Cauwenberghs, *et al.* "Rapid determination of particle velocity from space-time images using the Radon transform." *Journal of computational neuroscience*, 29(1-2), 5–11 (2010).
22. Beat Münch, Pavel Trtik, Federica Marone, *et al.* "Stripe and ring artifact removal with combined wavelet — Fourier filtering," *Opt. Express* 17, 8567-8591 (2009).
23. Sato Y, Nakajima S, Shiraga N, *et al.* "Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images". *Med Image Anal.* Jun (1998).
24. C.H. Li, C.K. Lee "Minimum cross entropy thresholding", *Pattern Recognition*, Volume 26, Issue 4 (1993).
25. Jean-François Gilles, Marc Dos Santos, Thomas Boudier, *et al.* "DiAna, an ImageJ tool for object-based 3D co-localization and distance analysis", *Methods*, Volume 115 (2017).
26. Chris Xu and Watt W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm," *J. Opt. Soc. Am. B* 13, 481-491 (1996).

27. Srinivasan VJ, Yu E, Radhakrishnan H, et al. Micro-heterogeneity of flow in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion revealed by longitudinal Doppler optical coherence tomography and angiography. *J Cereb Blood Flow Metab.* (2015).
28. RUMBAUT, R.E. and SIAL, A.J., Differential Phototoxicity of Fluorescent Dye-Labeled Albumin Conjugates. *Microcirculation*, 6: 205-213 (1999).

CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : PHASE CONTRAST REFLECTANCE CONFOCAL BRAIN IMAGING AT 1650 NM

Afin de satisfaire le second objectif de ce travail de synthèse, un système d'imagerie intrinsèque par réflectance confocal a été conçu et utilisé pour fin d'imagerie corticale. Ce système d'imagerie utilisant la bande spectrale NIR-II (1650nm) procure une diffusion et une atténuation moindre que dans une différente gamme spectrale. Ce système est aussi peu coûteux permettant une reproduction facilitée du montage en laboratoire. Puisque le système d'imagerie détecte la lumière réfléchié du système avec une source d'illumination à faible puissance, la toxicité lumineuse et l'influence du système d'imagerie sur les fonctions vasculaires s'en retrouvent amoindris. Ce microscope, ayant déjà été démontré fonctionnel par l'équipe de Prof. Chris Xu à l'Institut de Cornell (Fei Xia, 2018), est comparé à de l'imagerie multiphotonique afin de distinguer les composantes corticales dans chaque modalité. Cette habile étude présente la distinction des neurones, des vaisseaux sanguins et des cellules corticales dans chaque modalité et implémente un système de balayage à haute fréquence afin d'en permettre l'imagerie vidéo. Afin d'explorer les avenues qu'un tel système d'imagerie intrinsèque offre, trois idées sont implémentées sur une amélioration du système original. En premier lieu, l'utilisation de compteurs de photons par nano fils supraconducteurs est implémentée afin de permettre une sensibilité accrue ayant pour but d'augmenter la profondeur d'imagerie démontrée avec ce microscope par réflectance confocal. Deuxièmement, l'utilisation du contraste de phase a été implémentée afin d'augmenter le contraste des corps cellulaires et ainsi distinguer le relief provenant des différentes structures. Finalement, la mise en marche d'une méthodologie afin de dissocier les structures dynamiques et statiques se basant sur le filtrage temporel passe-haut a été testée afin de mettre en évidence les composantes dynamiques des tissus corticaux (i.e. vaisseaux sanguins). Cet article a été soumis au journal *Journal of Biomedical Optics* le 23 octobre 2023. Ce travail sera aussi présenté au SPIE BiOS 2024.

Authors : Patrick Delafontaine-Martel^{1,2}, Cong Zhang^{1,2}, Andreas Linninger³, Frédéric Lesage^{1,2}.

1. Département de génie électrique, Polytechnique Montréal, Montréal, Canada.
2. Institut de cardiologie de Montréal, Montréal, Canada.
3. Département de génie Biomédical, Université de l'Illinois Chicago, Illinois, USA.

Abstract : The imaging depth of microscopy techniques is limited by the ability of light to penetrate biological tissue. Recent research has addressed this limitation by combining a reflectance confocal microscope with the NIR-II (or Shortwave Infrared) spectrum. This approach offers significant imaging depth, is straightforward in design, and remains cost-effective. However, the imaging system, which relies on intrinsic signals, could benefit from adjustments in its optical design. To improve its ability to highlight the components of the cerebral cortex, the microscope was modified with a phase contrast scheme. Additionally, the research introduces an acquisition method for distinguishing dynamic signals from the background, allowing the creation of vascular maps similar to those produced by OCT (Optical Coherence Tomography). The system was tested on the somatosensory cortex, yielding cellular imaging with an imaging depth of up to 800 μm . It is worth noting that intact-skull imaging is also possible, although it may compromise the system's ability to generate vascular maps.

5.1 Introduction

In biological tissue, water absorption and associated O-H vibrational states lead to increased attenuation of light around 1450 nm (1). However, since the scattering of light is mostly inversely proportional to the wavelength, higher wavelengths (1600 nm to 1850 nm) have an increased effective attenuation length (2). With the advent of new NIR-II sources and low noise detection in the same spectral range, difficulties associated with imaging in this range have been reduced and therefore increase the interest in high wavelength imaging in-vivo microscopy. Some notable work led to demonstrations of three photon imaging (3), confocal fluorescence imaging via quantum dots excitation (4-5) and development of new probes targeting this spectral range (16-17).

In recent work, development of a long-wavelength reflectance confocal microscope has demonstrated good endogenous imaging capabilities when exploiting the NIR-II band (6). Polarization filtering was used to maximize signal to noise ratio leading to good imaging depth in tissue despite using low excitation power. However, some ambiguity in the intrinsic signal may arise when comparing vascular structures to myelinated axons. Such ambivalence was resolved in the aforementioned work via combining with molecular imaging such as third harmonic generation (THG).

There exists a huge body of work in ophthalmology imaging on the potential of phase contrast to help identify cellular interfaces. Building from the standard AOSLO imaging setup, phase contrast annexed to an AOSLO system was introduced by *Sulai et al.* (7). The lateral separation of the microscope's point spread function enhanced the overall contrast and ability to detect micro-features of the system (8). A similar approach has not been investigated in the brain since. However, usage of NIR-II spectral range exhibits reduced scattering of light which may facilitate the implementation of phase-contrast imaging and prove beneficial if applied to the reflectance confocal microscopy setup.

In the absence of a femtosecond source to generate THG, vascular angiography could benefit from a technique similar to speckle analysis in optical coherence tomography. Based on high frequency temporal filtering of the signal, OCT is able to retrieve erythrocytes paths *in-vivo* (9). A similar approach to the NIR-II reflectance confocal microscope could help distinguish axons from blood vessels in cortical tissue.

In this study, we investigate whether the combination of phase contrast scheme with NIR-II reflectance confocal microscope can provide intrinsic contrast to cells, including erythrocytes in the lumen. The study will show that combining this imaging setup with high frequency temporal filtering proves an efficient framework to detect the micro-vascular network structure (or angioarchitecture) and differentiate dynamic elements with flow such as blood vessels from static ones in the cortex. Our report describes the imaging setup, methods for dynamic structures imaging and *in-vivo* test with mice's skull left intact to test the capabilities of the custom microscope.

5.2 Methodology

5.2.1 Animal groups and surgery

The Animal Research Ethics Committee of the Montreal Heart Institute approved all procedures described here, in accordance with the Canadian Council on Animal Care recommendations and the protocol for this study was accepted under the ID 2023-3257. Mice underwent a diet of TEKLAD Global 19% protein extruded rodent diet (Envigo) and were kept under a light/dark cycle of 12 hours. Clean drinkable water was at all times available. We used $n = 9$ C57BL/6 J mice

(5M & 4F) kept in separate cages. Two distinct surgical procedures were used to enable cortical imaging with either intact skull or through a conventional craniotomy. For the craniotomy preparation, a cranial surgery was performed before the imaging sessions following a protocol identical to Lu X. *et al.*(10). During the surgery, body temperature, respiration rate and heart rate were monitored (LabeoTech, Canada). Lidocaine was injected onto the surface of the scalp for analgesia and the scalp was removed all under anesthesia (3% isoflurane in oxygen). For the conventional cranial window, a micro drill was used to open the skull. A Quarter Wave Plate (QWP, WPH502, Thorlabs), cut in 4 square pieces, were used as coverslips. UV sensitive dental cement was used to fix the QWP and UV light was shone for 20 seconds to cure the dental cement while a custom arm kept the cranial window slightly pressured on the cortical surface. For intact skull imaging, refractive index matching acrylic glue (Zap-a-gap CA+) was used to fix the reshaped (QWP) directly on the skull. Finally, a titanium bar was glued onto the head to serve as an anchor point to maintain the mouse brain fixed during imaging sessions. The imaging sessions were then performed while under isoflurane anesthesia (reduced to 1-2%), on the heating pad, while keeping the head of the mouse immobile throughout the imaging process. All experiments were terminal.

5.2.2 Optical system

The optical system design is similar to what is described in Fei Xia et al. (9) and is shown in Fig 1A. A polarized superluminescent diode source (FPL1059P, Thorlabs) injects a 1650 nm light in the system with a collimator (ZC618SMA-C, Thorlabs). A first half-wave plate is used to optimize the transmitted light in a polarized beam splitter and a second half-wave plate changes the polarization of the excitation light to enable redirection of the collected light to the detectors through a polarization filtering scheme (see below). The raster scan setup is made from two galvanometric mirrors (Thorlabs) combined through two parabolic 90° off-axis mirrors (MPD129-M01, Thorlabs) in order to discard any beam walking effect. The excitation light is then expanded by a 6x beam expander in order to fill the back aperture at the objective plane. In order to dissociate the excitation light and the spurious reflections on the lenses from the collected light, a quarter-wave plate is inserted in the optical path after the microscope objective (XLPLN25XWMP2, Olympus) and serves as cranial window (see above). The back and forth passage in the later plate will cause a rotation of the polarized light which will be refocused and descanned in order to be reflected at the polarization beam splitter. Moreover, a heavy water drop was used to couple the microscope

objective to the cranial surface and to provide a liquid media which has low water absorption at 1650 nm. 60mm lenses are used to focus the detected light on the edge of the silver coated knife edge mirror (MRAK25-P01) and to collimate the beam back towards collimators (PAF2P-18C) fixed to fibers having a single mode diameter of 10 μm . Fibers were connected to superconducting nanowire single-photon detectors (Opus One, Quantum Opus). This configuration provides a pin-hole equivalent to ~ 0.8 Airy unit. The galvanometric mirrors were operated via an acquisition card (Multifunction I/O device, National Instrument) connected to a computer. Both detector outputs were connected to counter channels and were synchronous with the raster scan setup. The signal is sent back to the computer to create the final image. Subtraction of both images for phase-contrast imaging is done via custom software implementation and the optical system was programmed in python.

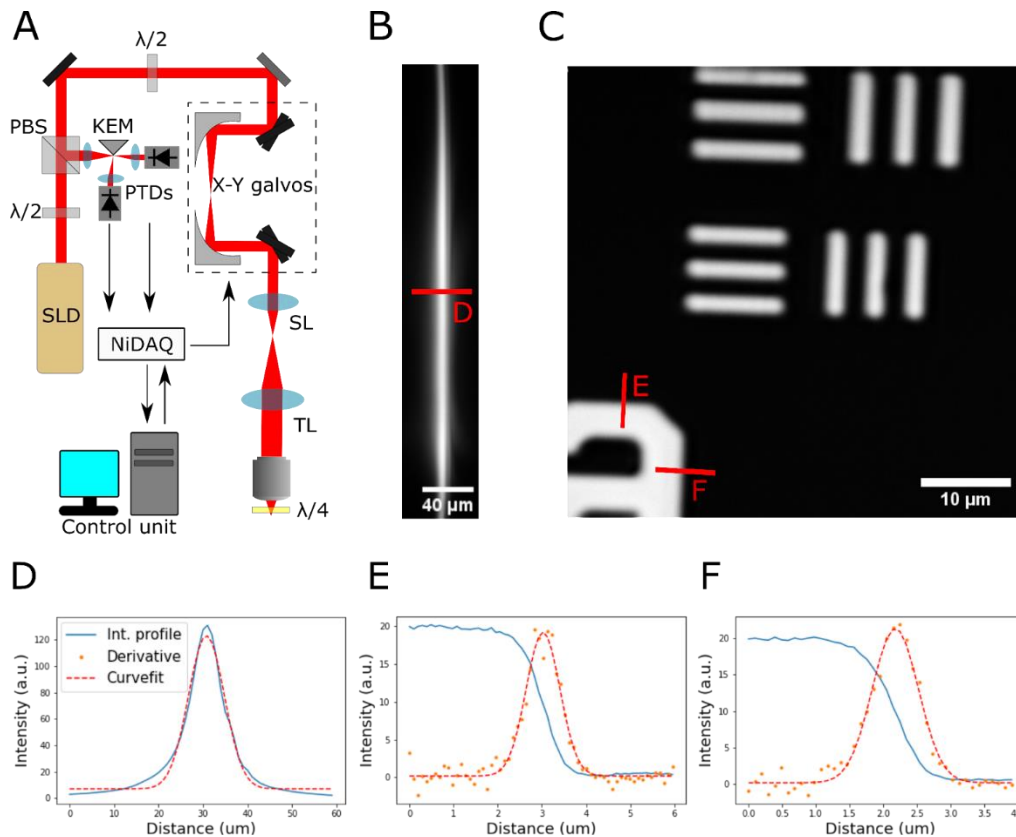


Figure 5.1 : Schematic presentation of the reflectance confocal microscope designed in this work (A). Polarization separation is provided by the quarter-wave plate which feeds back reflected signal to descanned the received light. The knife-edge mirror is used to create the phase contrast imaging scheme. NiDAQ: National Instrument Acquisition card. SLD: SuperLuminescent Diode. $\lambda/2$: Half-

wave plate. PBS: Polarization beam splitter. SL: Scan Lens. TL: Tube Lens. $\lambda/4$: Quarter-wave plate. KEM: silver coated Knife-Edge Mirror. PTDs: Photon Detectors. Axial image stack with 1 μm steps has been acquired (B) providing an axial LSF. The horizontal plane of the image shown is the depth axis. A USAF 1951 resolution target has been imaged to characterize the lateral resolution (C) and the ESF method was chosen. The intensity profile in the axial direction and lateral direction are shown and the full width half max was used as a metric for resolution.

5.2.3 Repeated line acquisition scheme

The ability of reflection confocal microscopy to image cellular structures is an opportunity to take advantage of temporally changing signals from cortical tissue. Using a methodology inspired from the optical coherence tomography angiography (11), speckle temporal analysis may be useful in this imaging system to provide similar outputs. Beyond standard scanning to generate images, we applied the repeated line method and acquired up to 100 images at random locations with a sampling frequency of $\sim 250\text{kHz}$ per point to investigate the capabilities of the system at retrieving vascular structures.

5.3 Results

5.3.1 Optical system characterisation

To quantify the imaging capabilities of the optical system, the lateral edge spread function (ESF) and axial line spread functions (LSF) were analyzed. For the ESF, a USAF 1951 resolution target (R1L1S1P, Thorlabs) was used to create a strong contrast with minimal power input (12.5 nW) to ensure no saturation at the photon counter detection rate. Mapping the ESF from the number near the 7th group and 5th element gives the lateral LSF via the derivative. An exponential curve fit provides a lateral full width half max of 920 ± 10 nm in the horizontal direction and 820 ± 10 nm in the vertical direction. This discrepancy between both axes may arise from the parabolic mirror alignment. However, the Rayleigh criterion for lateral resolution with our setup provides a value of ~ 830 nm which is in the same range of values as the LSF here analyzed which tends to indicate that our setup is almost diffraction limited (Fig 1 B-C & E-F). For the axial line spread function, a mirror surface was imaged with a stack of 50 images separated by 1 μm steps. A curve fit over the resulting intensity profile shows an axial FWHM of 8 μm (Fig 1D).

5.3.2 Phase contrast imaging can distinguish individual cell bodies

The intrinsic contrast retrieved from confocal imaging at this wavelength is partly confounded since different morphological structures can exhibit relatively similar signals. In order to provide more insight on the cortical constituents, a phase contrast scheme was introduced to the reflective confocal microscope. 150 μm wide images were acquired at different depths to test the system. To reproduce the intrinsic common signal from reflective confocal microscopy the signal of both collection channels can be added. Such acquisitions capture different structures such as myelinated axons, blood vessels and other glial cells up to 800 μm . As shown in Fig. 2, red and yellow arrows point to vascular structures and myelinated axons respectively. By subtraction of both channels, the phase contrast scheme delineates the reflective surface of the cellular bodies. Normalizing the signal background to a value around 0 outlines the cellular components in the image and clear out the low spatial frequency signal. Moreover, a left-right differentiation enhances cellular interfaces producing a high spatial frequency signal in the tissue. Anatomical features acquired in the cortex conform to descriptions found in atlases. However, the distinction between myelinated axons and small vessels remains hard to identify, since the only difference is the edge of each structure. A quantitative framework could be a useful tool to automatically label vasculature and anatomical features such as axons.

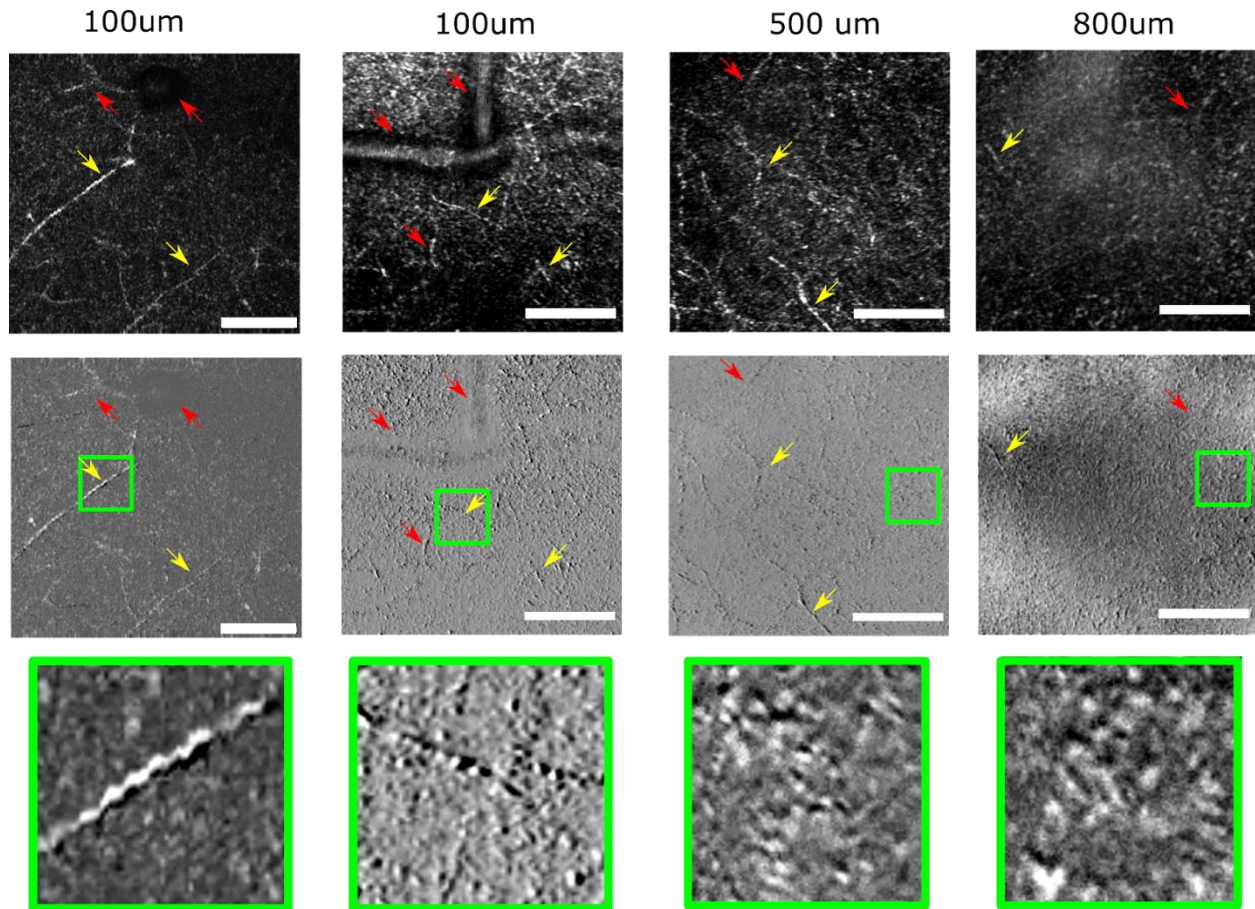


Figure 5.2: Imaging capabilities and phase contrast imaging at different depths. The images on the upper row is the addition of both channels of the reflectance confocal microscope providing the complete intrinsic signal from different cortical components. The subtraction of both channels, shown in the middle row, provides the phase contrast images which delineated the edges of the blood vessels (red arrows) and myelinated axons (yellow arrows). Close-ups of 30 μm field of view of cellular constituents are presented in the last row. Green boxes present the respective close-up images of cells.

5.3.3 Temporal analysis provides clear vascular map

From the images collected by the reflective confocal microscope, raw outputs showed that some tubular structures had internal intermittent signals. Hence, by performing a temporal variance computation (σ) of the differential image ($\Delta f(x,y,t)$) over the temporal mean ($\mu(x,y)$) of the addition of the 2 channels ($f_1(x,y,t), f_2(x,y,t)$) over 'T' images, dynamic structures were outline from static components in the image.

$$\sigma_t = \frac{\sum_{t=1}^T (\Delta f(x,y,t) - \mu_t(x,y))^2}{\mu_t(x,y)} \quad (1)$$

where :

$$\Delta f(x, y, t) = f_1(x, y, t) - f_2(x, y, t) \quad (2)$$

and

$$\mu_t(x, y) = \frac{\sum_{t=1}^T (f_1(x,y,t) + f_2(x,y,t))}{T} \quad (3)$$

In order to provide clear images of the vascular networks, a typical acquisition at 250 μm deep, 256 by 256 pixels at 102kHz sampling per point with 3 consecutive line acquisition is shown at Fig. 3. The resulting image is the mean of 5 consecutive line scan acquisitions, which brings the time of acquisition to provide an image of the vascular component to around 10 seconds. Repeating this acquisition process while lowering the microscope objective down enables the digital reconstruction of angiograms. As shown in Fig. 3 in the dotted box, the same processing methodology is applied to an imaging sequence while 3 μm steps provided by a linear stage drive the microscope's objective down towards the cortex. The image stack presented starts at 100 μm and goes up to 280 μm deep in the somatosensory cortex.

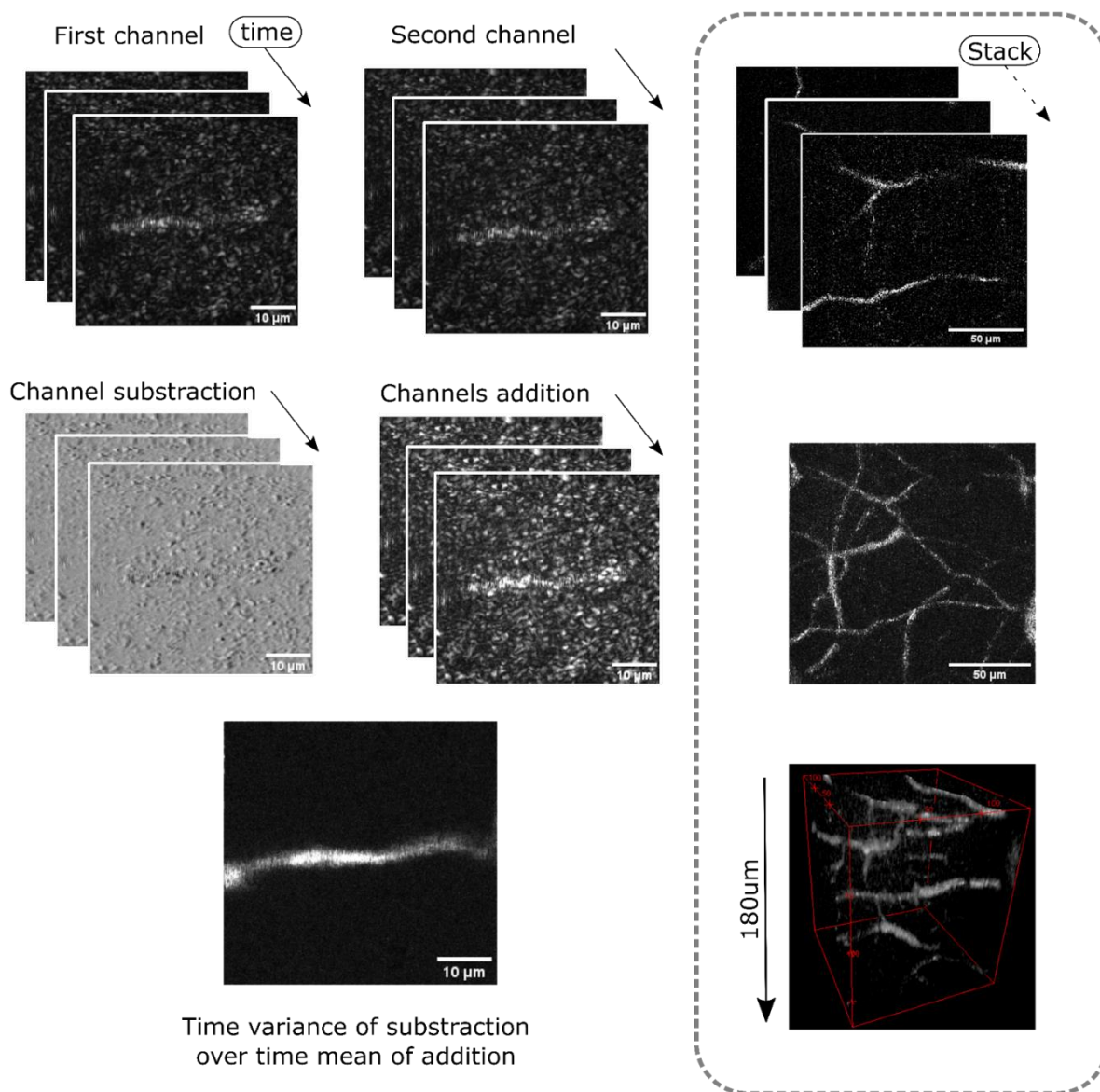


Figure 5.3: Raw images and signal processing routine from the reflective confocal microscope with a phase contrast scheme. The raw images from both channels are subtracted from one another to create the phase contrast image. Repeated acquisition on the fast axis scanner dimension provides temporal information which is retrieved via a temporal variance computation divided by the addition of the two raw images. The resulting image provides a vessel network map arising from the erythrocyte passage in the blood vessels. In the dotted box, the same image processing technique is repeated over 180 μm thickness in the somatosensory cortex to retrieve the volumetric vascular network.

5.3.4 Vascular components can be retrieved up to 800 μm deep

To highlight the potential for intrinsic imaging in the NIRII window, imaging sequences were performed to retrieve vascular structures up to 800 μm deep in the somatosensory cortex. Examples at different depths of raw signal from 1 channel, the presented phase contrast scheme and the temporarily changing structures highlighted by the variance computation are shown in Fig. 4. The acquisition time was increased by performing a higher number of repeated lines of acquisition in the image. For instance, at 400 μm , 5 consecutive repetitions for each line was performed. Deeper at 800 μm , 10 repetitions were acquired thus increasing the acquisition time at different depths accordingly. Trials to recover vascular signals over 800 μm were unfruitful even with 20 repetitive acquisitions.

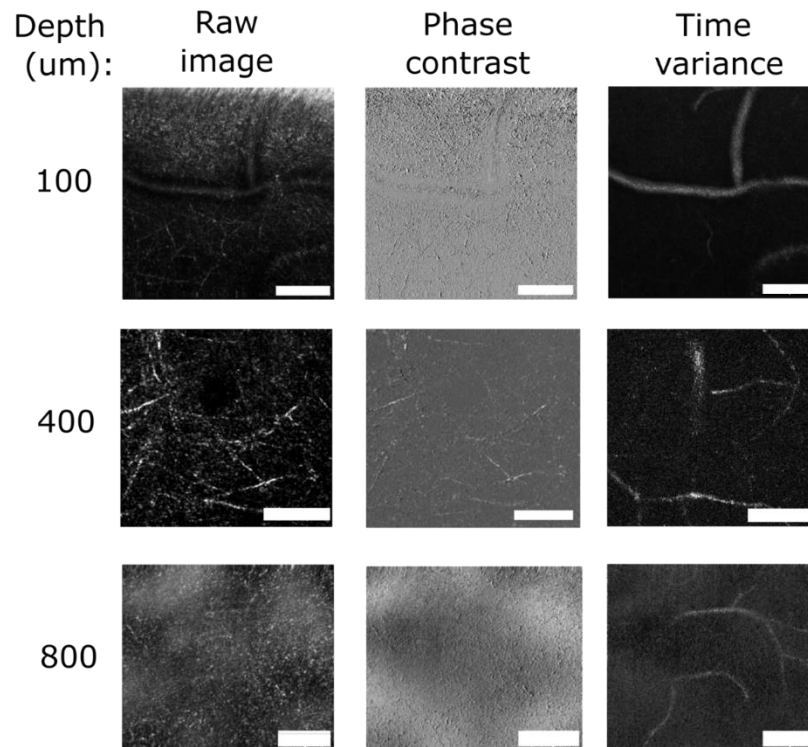


Figure 5.4: Demonstration of vascular component retrieval at different depths. For each depth, the raw signal, the subtraction of both channels and the variance computation are presented. Tubular components in the raw signal can be attributed to either myelinated axons or blood vessels, but the temporal computation scheme allows to differentiate dynamic vascular structures from static elements, i.e. axons. All scale bars are 50 μm wide.

5.3.5 Erythrocytes can be monitored

Rapid scans of dynamic structures were performed in order to observe the erythrocytes pass-by in capillaries. By fixing the scan length to 20 μm with a line rate of 800 Hz over the lumen of a capillary, erythrocyte passage was monitored. As shown in Fig.5, this imaging mode can be performed up to 800 μm deep in the cortex. Comparison between different depths showed a similar level of signal coming from erythrocytes in the lumen when increasing the power of the excitation light.

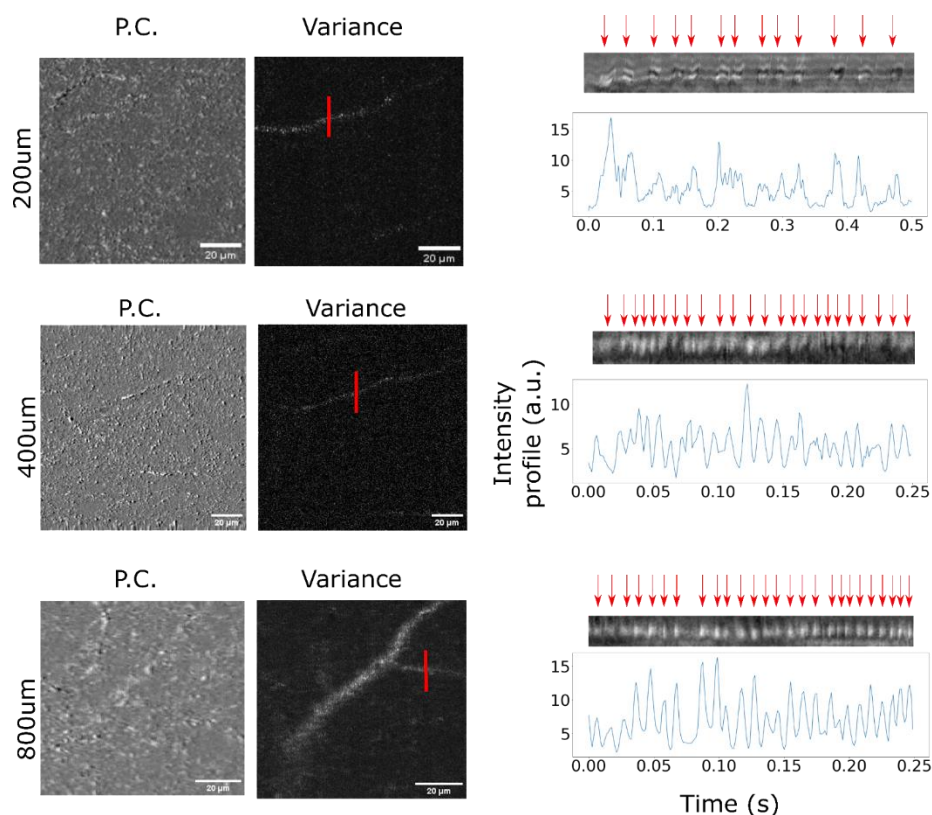


Figure 5.5 : Demonstration of erythrocyte monitoring. The variance computation of the images can generate vascular network map that incorporates small capillaries in the cortex. Using the fast axis scanning mirror at 800 hz and by placing the confocal microscope on top of the detected capillary enables the visualization of the erythrocytes passage in the lumen.

5.3.6 Intact skull imaging can also retrieve cortical cells

Usage of NIR-II spectral range enables us to acquire micro-anatomical images through the skull with minimal scattering. Images at different depths through the skull were compared to acquisitions obtained after craniotomy. Fig. 6 shows acquisitions at different depths of cells' bodies comparing

a complete craniotomy and an intact skull imaging with a 20 μm field of view. Up to 500 μm , the images reproduce glomerular bodies as observed in the craniotomy data. However, at 800 μm , the noise coming from the relatively high illumination hampered the nature of the signal and what appeared to be the cells body was lost in the noise. In contrast, during an open cranial window imaging, superior signal to noise ratio provided a good delineation of the cellular constituents even at a depth of 800 μm . To quantify the effect, the signal to noise ratio was computed from the absolute signal from the phase contrast images. While the craniotomy images had a signal to noise ratio (SNR) higher than 5, the imaging through the intact skull images exhibited lower SNR up to 4.

With the vascular imaging protocol, only peripheral vessels up to 200 μm deep could be imaged with the temporal filtering method (see supplemental material). Moreover, capillary vessels could not be detected and retrieved in this manner .

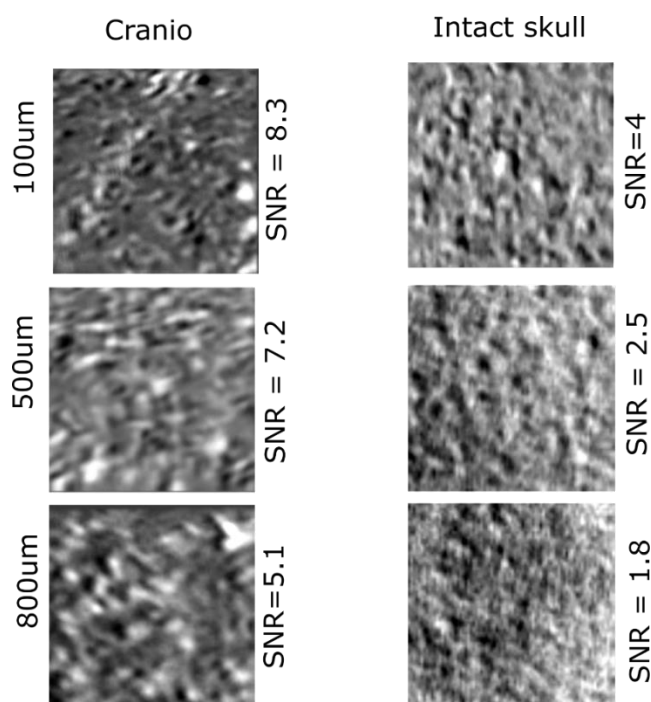


Figure 5.6: Comparison between imaging through intact skull and a cranial window. Signal to noise ratios are indicated next to the images at different depths. Images through the intact skull exhibit lower signal to noise ratios than their counterpart at the same depth through a cranial window. Through the skull, cells bodies are distinguishable up to 500 μm but no vessels were retrieved past 100 μm using the temporal filtering technique. Field of view of all images is 20 μm .

5.4 Discussion

5.4.1 Visible structures from the phase contrast reflectance confocal microscope

Reflectance confocal microscopy can provide convoluted signals with low selectivity for the biological constituents. This low selectivity is a result from the nature of the captured signal which comes from reflected light onto the interface of media provided by changes in refractive index and absorption throughout the biological tissue. Past observations with phase contrast imaging focusing on lymphocytes through a transparent medium were able to depict the immune response from LPS induced inflammation (12). Such discerning power would be highly desirable for cortical imaging which could eliminate the need for fluorescent dyes for cortical cells in some experiments. Using a molecular probe entails a biomolecular bond with the observed cell, which might interfere with their normal functions. The need for a biological probe is eliminated in phase contrast acquisition, although the feasibility of such an intrinsic imaging technique in the presence of cortical tissue scattering needed to be investigated. Here, we demonstrated that the reduced scattering from the usage of the NIR-II spectral band could enable phase contrast up to 800 μm deep in the cortex.

Observing the images recorded with our microscope using phase contrast, the different anatomical structures such as myelinated axons, blood vessels and glial cells seem to provide signals compatible with this mechanism and clearly delineate structures such as seen in Fig. 2. Myelinated axons, distinguishable by their elongated shape and static signal, reflected a significant amount of light, probably arising from the myelinated sheets or Schwann cells primarily constituted of fatty molecules. Schwann cells may be seen as little bumps arranged in elongated columns. Depending on microscope placement and image resolution, these myelinated axons can be also seen as continuous tubules. In the cases of erythrocytes and glial cells, the change of refraction index at the cellular wall may be the mechanism reflecting the detected light. Since the phase contrast imaging is known to exhibit signals which distinguish wave front differences, the shadow observed in Fig. 5 is a good indicator of round surface projecting light back to the objective. Such detected light is then separated in two halves in the wave-vector domain via the split detection scheme, thus creating a sensitivity of the angle of incidence of light over the biological structure. In the literature of phase contrast imaging, most applications of epi-detection phase contrast scheme are used with

a highly reflective surface beneath the sample in order to illuminate through the cells to shed light to internal structures (13). Since the usage of in-vivo models restrains the possibility of such methodology, signal coming from the cortical tissue is mainly the reflected light from the cell surface.

5.4.2 Repetitive image acquisition can provide a vascular map

Temporal analysis of the reflective signal, yields a vascular network in the imaging depth of the confocal microscope. This capability of revealing the path of dynamically flowing erythrocytes stems from their reflection in the vessels' lumen. This variance imaging scheme was shown to delineate the vascular architecture with little signal contamination from static structures. The variance scheme while performing an image stack provided connectivity of descending vessels. This connectivity of the vascular map may arise from the erythrocyte brief passage through the imaging plane of the microscope which is hard to decipher in the reflectance confocal microscope's raw images. Variance imaging of axons aligned with the optical axis did not generate sufficient contrast because collinear orientation does not produce enough reflection, so that their signal appears static.

5.4.3 Phase contrast scheme may degrade discerning power deep in the tissue

The phase contrast scheme helps to reduce the background signal that could come from the optics since common signals in both channels are subtracted to one another. Moreover, the polarization filtering of the spurious reflection is able to remove all the characteristic noise up to 10 nW under the objective. The very high sensitivity of the system is due to the use of SNSP (Quantum Opus) photon counters. Even with this sensibility, no structure was visible past ~1 mm of depth. A similar system has been shown to image over the visual cortex of mice up to a depth of 1.2 mm (6). The different cortical area and usage of a split detection scheme may be the cause that impaired the capabilities of deep light collection.

5.4.4 Decent imaging of cortical structures through the skull

Imaging through the intact skull deteriorated the overall sensitivity of the microscope to the reflective constituents of the cortical tissue up to 500 μm depth in the cortex. The signal collected provided vascular images only at superficial depths (under 100 μm) hence restricting the capabilities of the imaging setup to perform through skull longitudinal observation (see

supplemental images). It is clear that the deterioration of the resolution arises from the passage through the skull which could be avoided with different techniques such as skull optical clearing (14) or adaptive imaging via frontwave manipulation (15). However, optical clearing requires access to the skull surface by fixing a quarter wave plate onto the surface of the skull, which prevents the manipulation required. Implementation of an adaptive optic component to the system may be more suitable for future experiments.

5.4.5 Limitations

While the proposed imaging system is relatively low cost and effective for generating phase contrast from intrinsic signals, the long imaging sequences needed for acquiring clear angiograms of the vascular structure seems to limit its potential. A way to reduce acquisition time could be via a fast scanning method with a resonant scanning mirror to push further the observation of biological cells' functions in the cortical tissue.

On the methodology front, the usage of a QWP as a cranial window may be inconvenient regarding surgery manipulations and window clearance. Advent of high numerical aperture microscope objectives with integrated QWP would open the way to skull clearing method without the need for creating cranial windows.

5.5 Conclusion

In this work, a phase contrast scheme was integrated in a long-wavelength reflectance confocal microscopy. Derived images enable the detection of the glomerular aspect of singular glial cells while rendering tubular structures such as myelinated axons and vessels.

Moreover, by exploiting temporal variance, signals arising from the erythrocyte passage in the lumen of blood vessels enables the reconstruction of connected angiograms.

Intact skull imaging was also shown to be feasible which could be useful in certain applications not requiring deep cortical imaging. Future work will aim to accelerate acquisitions and investigate contrast associated with recruitment of immune cells.

5.6 Disclaimer

F. Lesage has minor ownership in Labeo Technologies Inc.

5.7 Data availability

Images taken and post-processed in this work are available upon request.

5.8 Acknowledgment

This work was supported by the NIH NIA 1R01AG079894-01 and a Canada Research Chair to F. Lesage. We would like to thank Joel Lefebvre, Frans Irgolitsch, Marleen E. Bakker, Valerie Daigneault and Enzo Dellamarre for fruitful discussions.

5.8 Références

1. K. F. Palmer and D. Williams, "Optical properties of water in the near infrared," *J. Opt. Soc. Am.*, 64, 1107--1110, (1974).
2. Cao Jie, Zhu Binling, Zheng Kefang, He Songguo, Meng Liang, Song Jibin, Yang Huanghao Recent Progress in NIR-II Contrast Agent for Biological Imaging *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*,7,2020
3. Horton, N., Wang, K., Kobat, D. *et al.* *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nature Photon* 7, 205–209 (2013).
<https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.336>
4. Wang F, Ren F, Ma Z, Qu L, Gourgues R, Xu C, Baghdasaryan A, Li J, Zadeh IE, Los JWN, Fognini A, Qin-Dregely J, Dai H. *In vivo* non-invasive confocal fluorescence imaging beyond 1,700 nm using superconducting nanowire single-photon detectors. *Nat Nanotechnol.* 2022 Jun;17(6):653-660.
5. Chen, L.-L., Zhao, L., Wang, Z.-G., Liu, S.-L., Pang, D.-W., Near-Infrared-II Quantum Dots for *In Vivo* Imaging and Cancer Therapy. *Small* 2022, 18, 2104567.
6. Xia F, Wu C, Sinefeld D, Li B, Qin Y, Xu C. *In vivo* label-free confocal imaging of the deep mouse brain with long-wavelength illumination. *Biomed Opt Express.* 2018 Nov 29;9(12):6545-6555.
7. Sulai YN, Scoles D, Harvey Z, Dubra A. Visualization of retinal vascular structure and perfusion with a nonconfocal adaptive optics scanning light ophthalmoscope. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis.* 2014 Mar 1;31(3):569-79.

8. Drew Scoles, Yusufu N. Sulai, Christopher S. Langlo, Gerald A. Fishman, Christine A. Curcio, Joseph Carroll, Alfredo Dubra; In Vivo Imaging of Human Cone Photoreceptor Inner Segments. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014;55(7):4244-4251.
9. Srinivasan VJ, Jiang JY, Yaseen MA, et al. Rapid volumetric angiography of cortical microvasculature with optical coherence tomography. *Opt Lett* 2010; 35: 43–45.
10. Xuecong Lu, Mohammad Moeini, Baoqiang Li, Sava Sakadžić, Frédéric Lesage, "Voluntary exercise confers protection against age-related deficits in brain oxygenation in awake mice model of Alzheimer's disease," *Proc. SPIE 10481, Neural Imaging and Sensing 2018, 104811G* (12 February 2018)
11. Ruikang K. Wang, Steven L. Jacques, Zhenhe Ma, Sawan Hurst, Stephen R. Hanson, and Andras Gruber, "Three dimensional optical angiography," *Opt. Express* 15, 4083-4097 (2007)
12. Aby Joseph, Colin J Chu, Guanping Feng, Kosha Dholakia, Jesse Schallek, Label-free imaging of immune cell dynamics in the living retina using adaptive optics (2020) *eLife* 9:e60547.
13. Matlock, Alex, et al. "Inverse scattering for reflection intensity phase microscopy." *Biomedical optics express* 11.2 (2020): 911-926.
14. Zhao, YJ., Yu, TT., Zhang, C. *et al.* Skull optical clearing window for *in vivo* imaging of the mouse cortex at synaptic resolution. *Light Sci Appl* 7, 17153 (2018).
15. Jo, Yonghyeon, et al. "Through-skull brain imaging in vivo at visible wavelengths via dimensionality reduction adaptive-optical microscopy." *Science advances* 8.30 (2022): eabo4366.
16. Cao, J., Zhu, B., Zheng, K., He, S., Meng, L., Song, J., & Yang, H. (2020). Recent progress in NIR-II contrast agent for biological imaging. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 487.
17. Antaris, A. L., Chen, H., Cheng, K., Sun, Y., Hong, G., Qu, C., ... & Dai, H. (2016). A small-molecule dye for NIR-II imaging. *Nature materials*, 15(2), 235-242.
18. Srinivasan, Vivek J., et al. "Optical coherence microscopy for deep tissue imaging of the cerebral cortex with intrinsic contrast." *Optics express* 20.3 (2012): 2220-2239.

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux présentés dans le cadre de ce travail de thèse ont pour objectifs généraux d'investiguer les modalités d'imagerie afin d'observer les fonctions vasculaires et développer des outils afin de perturber ces dernières. Afin de parvenir à cet objectif général, deux objectifs spécifiques ont été ciblés et complétés par le biais d'articles scientifiques présentés aux chapitres 4 et 5 de cette thèse.

6.1 Objectif 1

Le premier objectif défini dans cette thèse était de développer une méthodologie permettant le blocage des capillaires sanguins de façon contrôlée et reproductible afin d'offrir une nouvelle avenue pour observer les blocages transitoires et d'en étudier les mécanismes sous-jacents. Afin de remplir cet objectif, un travail de recherche se basant sur l'excitation multiphotonique d'un agent de contraste nommé le Rose Bengal a été complété et soumis au journal scientifique *Journal of Cerebral blood flow and Metabolism*. Les points saillants de ce travail de recherche sont l'utilisation d'un système bimodal afin d'observer les fonctions vasculaires et l'utilisation de la modalité multiphotonique afin d'exciter l'agent colorant Rose Bengal dans le but de perturber les fonctions vasculaires. Par le biais d'analyse histologique sur des coupes corticales, l'immunohistochimie et l'imagerie par fluorescence confocale, il est observé que l'excitation multiphotonique du Rose Bengal cause une création d'agents oxydants provoquant de l'inflammation localisée. Cette inflammation semble provoquer l'apparition de facteurs VCAM-1 au niveau des tissus vasculaires endothéliaux propices à une adhésion de neutrophiles. La présence des neutrophiles observés en immunohistologie est un indice de la nécessité de ces corps cellulaires pour la perturbation des fonctions vasculaires. Alors, cette cascade d'événements localisés dans le segment vasculaire ciblé cause un blocage de capillaire sanguin contrôlé et réversible dans les 24 heures. Ce modèle de perturbation offre une méthode reproductible et peu coûteuse aux laboratoires de neuroscience afin d'observer l'impact de perturbation au niveau des capillaires.

Afin de produire cette excitation ciblée à un capillaire sanguin, différents outils de programmation ont été nécessaires à la réalisation de ce but. Le système d'imagerie étant codé en python, l'utilisation de la cartographie de voltage des miroirs galvanométriques par le biais du module pyqtgraph afin de permettre une utilisation facilitée à l'utilisateur a été implémenté par un collaborateur (Dr. Rafat Damseh) et optimisé afin d'assurer que le trajet du microscope biphotonique sur le capillaire sanguin ciblé soit optimal. La mise en marche du protocole d'excitation ainsi que l'enregistrement et analyse ont été développés afin d'extraire les données du microscope et permettre la réalisation du travail de recherche. Cette aptitude à peaufiner des programmes de contrôle s'est avérée nécessaire à l'accomplissement de ce projet.

De plus, afin d'assurer que l'excitation ciblée multiphotonique des vaisseaux sanguins lorsqu'ils sont transfusés de Rose Bengal cause un blocage du flux d'érythrocytes, l'OCT est utilisé afin de corroborer l'observation de l'arrêt vasculaire. L'analyse de bimodalité indique que le passage des érythrocytes est le facteur permettant l'imagerie vasculaire en OCT. Ce lien entre le passage des cellules sanguines et le signal OCT, étant connu et ayant été vérifié à maintes reprises dans différents travaux de recherche, n'est pas une nouveauté en soi, mais permet une méthodologie supplémentaire afin de corroborer les modalités d'imagerie et leur mécanisme propre. De plus, un avantage supplémentaire du signal OCT est la rapidité de l'imagerie volumique permettant une identification des structures facilitée afin d'effectuer de l'analyse longitudinale. Cette corroboration de l'état d'irrigation des vaisseaux sanguins en biphotonique et OCT ont permis de transposer l'analyse longitudinale en OCT permettant l'observation du retour d'irrigation en moins de 24 heures. Afin de permettre une corroboration multimodalité semblable, une méthodologie d'alignement devait être mise en place afin d'assurer une superposition des champs de vue des modalités respectives. La mise sur pied d'un tel protocole a permis une minimisation des temps requis d'ajustement optique avant les acquisitions expérimentales, se traduisant par une optimisation de temps au niveau de la préparation pré-expérimentales.

En ce qui a trait au premier objectif spécifique de cette thèse, l'utilisation de différentes modalités d'imagerie (Fluorescence confocale, Biphotonique, OCT) combinée aux faits du développement de la méthodologie de blocages vasculaires transitoires remplit l'objectif établi. Ainsi, l'état

d'avancement de ce travail permet la mise en place du second objectif afin de raffiner les connaissances en ce qui a trait aux systèmes d'imagerie.

6.2 Objectif 2

Le second objectif spécifique de cette thèse est de développer un système d'imagerie de pointe permettant d'imager les corps cellulaires et surveiller les vaisseaux sanguins, le tout, sans interférer avec les fonctions vasculaires. La modalité d'imagerie choisie afin de réussir cet objectif est la microscopie par réflectance confocale utilisant la gamme spectrale NIR-II afin de réduire la diffusion et absorption optique dans les tissus corticaux. La mise en marche de ce système d'imagerie nécessite plusieurs étapes telles que la conceptualisation, le montage, l'alignement, l'implémentation du système d'opération, l'implémentation des fonctions d'imagerie, le montage d'un pipeline d'analyse d'image et la conceptualisation d'une étude afin de tester les capacités d'imagerie in vivo du système. En ce qui a trait à la conceptualisation, la mise sur pied d'un système ayant déjà été décrit et publié a permis de simplifier cette étape. Le montage du système a été effectué avec la liste des composantes optiques listées avec quelques modifications afin de satisfaire les vocations supplémentaires du système d'imagerie. L'implémentation passant par des outils de programmation comme Python, JupyterLab et Qt ont permis la mise en marche d'un système avec une interface utilisateur compréhensible afin d'assurer la pérennité du microscope au sein du laboratoire. Cette valeur ajoutée au système a assuré d'autres développements optique ou optomécaniques pouvant être tentée sur le microscope. L'analyse effectuée à l'aide d'outils de programmation est aussi incluse sur l'ordinateur afin de permettre une utilisation locale du système dans son ensemble.

De plus, l'utilisation du système d'imagerie développé dans le cadre d'une étude afin de le caractériser et de tester ces capacités d'imagerie in vivo a été un exercice précieux afin de parfaire les connaissances ayant trait aux interactions lumière-matière et la recherche scientifique se faisant dans le domaine de l'optique NIR-II. L'utilisation de ce système montrant la possibilité d'observer les composantes corticales à travers le crâne ouvre la voie à des études simples ne requérant pas de chirurgie invasive telle une craniotomie. Cette technique d'imagerie nécessite toutefois des améliorations telles qu'une rapidité d'imagerie accrue permettant la mise en lumière du mouvement

des composantes corticales d'intérêt ou leurs fonctions en temps réel dans certaines conditions. La profondeur d'imagerie sans craniotomie pourrait aussi être améliorée par le biais d'optique adaptative et ainsi permettre une profondeur d'imagerie comparable à de l'imagerie NIR, mais sans les nécessités incommodes que requiert une craniotomie.

En somme, le développement d'un système d'imagerie de pointe par réflectance confocale a été conceptualisé, monté et utilisé dans le cadre d'une étude soumise à *Journal of Biomedical Optics*. Ces étapes ayant mis en évidence le travail nécessaire pour réussir cet objectif témoignent de la complexité et la planification nécessaire à la réalisation d'un tel projet

6.3 Travaux Futurs

Afin d'utiliser les outils développés dans cette thèse, différentes avenues pourraient être investiguées afin de tirer avantage de la précision des perturbations vasculaires qu'offre la méthode de photothrombose multiphotonique. Premièrement, la comparaison de différentes méthodologies de perturbations vasculaires précises telles que l'ablation laser, le blocage induit par des microbilles et la méthode multiphotonique pourraient être fait dans le but d'observer la différence des impacts sur l'irrigation sanguine aux niveaux des capillaires sanguins, les changements sur la distribution d'oxygène corticale et l'activité neuronale. Cette dernière pourrait être surveillée par des modèles transgéniques exprimant de la fluorescence lors de l'activation des canaux calciques (GCaMP). Le changement de la distribution d'oxygène pourrait être analysé par le biais de sondes phosphorescentes comme le PtP-C343 ou l'Oxyphor2P. L'irrigation pourrait être observé par le biais de technologie d'imagerie comme l'OCT, l'OCT Doppler, imagerie par réflectance confocale ou l'imagerie par fluorescence. Ces mesures in vivo sont cruciales afin d'investiguer l'impacts des capillaires sanguins que provoque leur perturbation et ensuite vérifier si une analyse par simulation permettrait de prévoir, à une échelle microscopique, les changements de ces différentes métriques.

Différentes technologies récentes en imagerie intrinsèque pourraient être mises à profit dans le domaine de l'imagerie cortical. Une problématique observée dans le cadre du projet de synthèse est la complexité des manipulations chirurgicales afin de laisser place à la microscopie. De plus, l'imagerie de la distribution d'oxygène corticale est liée à l'insertion de sondes spécialisées phosphorescentes par le biais d'injections corticales complexes. Sachant que le dioxyde de carbone est un gaz avec des vibrations Raman actives, l'utilisation de l'imagerie Raman stimulé intrinsèque afin de comparer l'imagerie de la distribution d'oxygène à l'aide de sondes pourrait être une

expérience intéressante à conduire. Le Dioxyde de Carbone étant une molécule s'accumulant dans les tissus actifs comparativement à l'Oxygène se résorbant des zones corticales sous-irriguées, les distributions respectives de ces gaz pourraient être inversement corrélées. Si cette observation est vérifiable, l'utilisation de la microscopie intrinsèque pourrait être un outil supplémentaire quant à l'observation de métriques corticales.

Les modèles d'intelligence artificielle deviennent des outils puissants quant à leur capacité de distinguer et catégoriser des concepts dans une image. La microscopie étant une discipline profitant grandement de l'intelligence artificielle, la mise en marche d'interface de reconnaissance des constituants biologique est une utilisation puissante permettant de simplifier les observations biologiques. Des expérimentations mettant en place un pipeline d'entraînement d'intelligence artificielle sur des acquisitions bimodalités (i.e. intrinsèque et moléculaire) pourrait offrir un outil d'identification sans seconde modalité. Le déploiement public d'un tel outil serait un atout indéniable pour les laboratoires de neuroscience n'ayant pas d'accès privilégié à une panoplie de microscopes de pointes.

En somme, la mise au point de nouveaux outils d'imagerie intrinsèque et de nouvelles techniques d'analyse de microscopie est une avenue intéressante afin d'élargir la sélection de méthodologie disponible aux laboratoires de neuroscience et d'imagerie. De plus, la recherche, la démonstration et le peaufinage de nouvelles techniques d'imagerie est essentiel afin d'assurer l'exploration du potentiel qu'offre ces types de systèmes.

CHAPITRE 7 CONCLUSION

Avec l'intérêt grandissant d'étudier les maladies neurodégénératives et sachant que l'implication du système vasculaire est indéniable, il y a nécessité de développer des méthodologies afin de perturber les fonctions des vaisseaux sanguins et des techniques de microscopie afin d'étudier sous plusieurs aspects les fonctions des tissus corticaux. Les méthodologies de perturbations vasculaires sont nombreuses, mais peu se spécialisent dans la perturbation d'un seul vaisseau sanguin de diamètre minimal, soit le capillaire. La mise sur pied d'une telle méthodologie offre la possibilité de perturbation locale afin d'ouvrir la voie aux expérimentations se concentrant sur l'impact de blocage vasculaire comme la distribution d'oxygène dans les tissus corticaux ou la cartographie du flux vasculaire avant et après le blocage de capillaire sanguin. La mise sur pied d'une expérience combinant l'imagerie tridimensionnelle des vaisseaux sanguins, le blocage ciblé de quelques capillaires, la cartographie du flux avant et après blocage et le tout avec l'analyse du changement de profil d'oxygénation pourrait constituer une étude solide afin d'offrir une vision globale de l'impact d'un capillaire sanguin sur la distribution locale de nutriments et de flux sanguin.

La microscopie par réflectance confocale, étant une modalité d'imagerie innovante et relativement peu coûteuse pour son application, est habile à imager les cellules corticales et de mettre en lumière les vaisseaux sanguins tout en tirant avantages qu'offre le contraste de phase et la mise en place d'une méthodologie d'imagerie vasculaire. Ce système offre une pénétration lumineuse accrue lorsqu'utilisé à travers une craniotomie, mais permet l'imagerie des cellules corticales en surface sans chirurgie invasive. Cette technique de microscopie nécessiterait cependant des améliorations qui pourraient être utilisées dans le cadre d'étude à volet physiologique. L'augmentation de la rapidité d'imagerie par le biais de miroirs résonants synchronisés à une carte d'acquisition et l'intégration d'un miroir déformable afin d'optimiser la profondeur d'imagerie permettrait sans doute de pousser la pénétration optique du système tout en observant en temps réel le mouvement des cellules corticales. En combinant le tout à des modèles murins exhibant des symptômes apparents à des maladies neurovasculaires, un certain marqueur cortical pourrait être étudié profondément dans le cortex (présence de blocages transitoires, neutrophiles, plaques amyloïdes Beta). De plus, la mise en annexe de ce système avec une modalité moléculaire telle que la microscopie trois photons afin de corroborer des observations en imagerie intrinsèque et moléculaire.

BIBLIOGRAPHIE

A.Gh. Podoleanu, "Optical coherence tomography." *Journal of microscopy* 247.3 (2012): 209-219.

Adolf F. Fercher, et al. "Optical coherence tomography-principles and applications." *Reports on progress in physics* 66.2 (2003): 239.

Alberto Diaspro, Bianchini, P., Vicidomini, G. et al. Multi-photon excitation microscopy. *BioMed Eng OnLine* 5, 36 (2006).

Albrecht Sigler, Alexander Goroshkov, and Timothy H. Murphy. "Hardware and methodology for targeting single brain arterioles for photothrombotic stroke on an upright microscope." *Journal of neuroscience methods* 170.1 (2008): 35-44.

Anatoly B. Uzdensky, "Photothrombotic stroke as a model of ischemic stroke." *Translational stroke research* 9 (2018): 437-451.

Ankit Verma, Naveen Kumar Singhal, and Utpal Anand. "Photothrombotic Stroke Model." *Models and Techniques in Stroke Biology* (2021): 107-115.

Anthony Holtmaat, et al. "Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window." *Nature protocols* 4.8 (2009): 1128-1144.

Atkins, Peter William, and Julio De Paula. *Atkins' physical chemistry*. Oxford university press, 2014.

Bonnie O. Leung, and Keng C. Chou. "Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology." *Applied spectroscopy* 65.9 (2011): 967-980.

Brundel, M., De Bresser, J., Van Dillen, J. J., Kappelle, L. J., & Biessels, G. J. (2012). Cerebral microinfarcts: a systematic review of neuropathological studies. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(3), 425-436.

Chris Xu, et al. "Multiphoton excitation cross-sections of molecular fluorophores." *Bioimaging* 4.3 (1996): 198-207.

Castonguay, A. (2017). *Histologie massive basée sur la microscopie à tomographie par cohérence optique* [Ph.D. thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.

Christi K. Madsen, and Jian H. Zhao. "Optical filter design and analysis: a signal processing approach." (1999).

Congping Chen, Zhentao She, Peng Tang, Zhongya Qin, Jufang He, Jianan Y. Qu, Study of neurovascular coupling by using mesoscopic and microscopic imaging, *iScience*, Volume 24, Issue 10, 2021, 103176, ISSN 2589-0042

Costantino Iadecola, "The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease." *Neuron* 96.1 (2017): 17-42.

Crumpler, Reece, Richard J. Roman, and Fan Fan. "Capillary stalling: a mechanism of decreased cerebral blood flow in AD/ADRD." *Journal of experimental neurology* 2.4 (2021): 149.

Daniel Barson, Hamodi, A. S., Shen, X., Lur, G., Constable, R. T., Cardin, J. A., ... & Higley, M. J. (2020). Simultaneous mesoscopic and two-photon imaging of neuronal activity in cortical circuits. *Nature methods*, 17(1), 107-113.

David Huang et al., *Optical Coherence Tomography*. *Science* 254, 1178-1181(1991).

David Kleinfeld, et al. "Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.26 (1998): 15741-15746.

Dietzel S, Pircher J, Nekolla AK, Gull M, Brändli AW, Pohl U, et al. (2014) Label-Free Determination of Hemodynamic Parameters in the Microcirculation with Third Harmonic Generation Microscopy. *PLoS ONE* 9(6): e99615.

Eitan Auriel, et al. "Estimating total cerebral microinfarct burden from diffusion-weighted imaging." *Stroke* 46.8 (2015): 2129-2135.

Erdener, Ş. E., Tang, J., Sajjadi, A., Kılıç, K., Kura, S., Schaffer, C. B., & Boas, D. A. (2019). Spatio-temporal dynamics of cerebral capillary segments with stalling red blood cells. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 39(5), 886-900.

Fei Xia, et al. "In vivo label-free confocal imaging of the deep mouse brain with long-wavelength illumination." *Biomedical optics express* 9.12 (2018): 6545-6555.

Giblin, John, et al. "High Throughput Detection of Capillary Stalling Events with Bessel Beam Two-Photon Microscopy." *bioRxiv* (2022): 2022-12.

Guang Yang et al. "Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice." *Nature protocols* 5.2 (2010): 201-208.

Golovynskyi, S., Golovynska, I., Stepanova, L. I., Datsenko, O. I., Liu, L., Qu, J., & Ohulchansky, T. Y. (2018). Optical windows for head tissues in near-infrared and short-wave infrared regions: Approaching transcranial light applications. *Journal of biophotonics*, 11(12), e201800141.

Hao Ou-Yang, Georgios Stamatas, and Nikiforos Kollias. "Spectral responses of melanin to ultraviolet A irradiation." *Journal of investigative dermatology* 122.2 (2004): 492-496.

Hartung G. et al., "Voxelized simulation of cerebral oxygen perfusion elucidates hypoxia in aged mouse cortex," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–28, 2021.

Hasani, E., Parravicini, J., Tartara, L., Tomaselli, A. and Tomassini, D. (2018), Measurement of two-photon-absorption spectra through nonlinear fluorescence produced by a line-shaped excitation beam. *Journal of Microscopy*, 270: 210-216.

Hye-Min Kang, Inkyung Sohn, and Chan Park. "Use of indocyanine green for optical analysis of cortical infarcts in photothrombotic ischemic brains." *Journal of Neuroscience Methods* 248 (2015): 46-50.

J.C. Cruz Hernández, Bracko, O., Kersbergen, C.J. et al. Neutrophil adhesion in brain capillaries reduces cortical blood flow and impairs memory function in Alzheimer's disease mouse models. *Nat Neurosci* 22, 413–420 (2019).

J. C. De La Torre, "Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics," *Lancet Neurol.*, vol. 3, no. 3, pp. 184–190, 2004.

Jonathan Elegheert, Behiels E, Bishop B, Scott S, Woolley RE, Griffiths SC, Byrne EFX, Chang VT, Stuart DI, Jones EY, Siebold C, Aricescu AR. Lentiviral transduction of mammalian cells for fast, scalable and high-level production of soluble and membrane proteins. *Nat Protoc.* 2018 Dec;13(12):2991-3017.

Joseph A. Izatt, Hee, M. R., Owen, G. M., Swanson, E. A., & Fujimoto, J. G. (1994). Optical coherence microscopy in scattering media. *Optics letters*, 19(8), 590-592.

Ki Hean Kim, Puoris' haag, M., Maguluri, G. N., Umino, Y., Cusato, K., Barlow, R. B., & de Boer, J. F. (2008). Monitoring mouse retinal degeneration with high-resolution spectral-domain optical coherence tomography. *Journal of vision*, 8(1), 17-17.

Kirsch, D. C., Chen, S., Sidharthan, R., Chen, Y., Yoo, S., & Chernysheva, M. (2020). Short-wave IR ultrafast fiber laser systems: Current challenges and prospective applications. *Journal of Applied Physics*, 128(18).

Kyuseok Im, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299-311.

Labat-Gest, V., & Tomasi, S. (2013). Photothrombotic ischemia: a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (76), e50370.

Luigi Yuri Di Marco, et al. "Vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease—A review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles." *Neurobiology of disease* 82 (2015): 593-606.

Marsili, F., Verma, V. B., Stern, J. A., Harrington, S., Lita, A. E., Gerrits, T., ... & Nam, S. W. (2013). Detecting single infrared photons with 93% system efficiency. *Nature Photonics*, 7(3), 210-214.

Nataliya Sadekova, et al. "Carotid calcification in mice: a new model to study the effects of arterial stiffness on the brain." *Journal of the American Heart Association* 2.3 (2013): e000224.

Nicholas G. Horton, et al. "In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain." *Nature photonics* 7.3 (2013): 205-209.

Patrick Delafontaine-Martel, Lefebvre, J., Tardif, P. L., Lévy, B. I., Pouliot, P., & Lesage, F. (2018). Whole brain vascular imaging in a mouse model of Alzheimer's disease with two-photon microscopy. *Journal of biomedical optics*, 23(7), 076501-076501.

Pavel S. Chelushkin and Sergey P. Tunik. "Phosphorescence lifetime imaging (PLIM): State of the art and perspectives." *Progress in Photon Science: Recent Advances* (2019): 109-128.

Per Wester, et al. "A photothrombotic 'ring' model of rat stroke-in-evolution displaying putative penumbral inversion." *Stroke* 26.3 (1995): 444-450.

Piergiacomo Calzavara-Pinton, et al. "Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging." *Photochemistry and photobiology* 84.6 (2008): 1421-1430.

Potma, E. O., Knez, D., Ettenberg, M., Wizeman, M., Nguyen, H., Sudol, T., & Fishman, D. A. (2021). High-speed 2D and 3D mid-IR imaging with an InGaAs camera. *APL photonics*, 6(9).

Richard F. Spaide., Fujimoto, J. G., Waheed, N. K., Sadda, S. R., & Staurenghi, G. (2018). Optical coherence tomography angiography. *Progress in retinal and eye research*, 64, 1-55.

Richard KP Benninger, and David W. Piston. "Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues." *Current protocols in cell biology* 59.1 (2013): 4-11.

Rius-Pérez, S., et al. "Vascular pathology: cause or effect in Alzheimer disease?." *Neurología (English Edition)* 33.2 (2018): 112-120.

Santisakultarm, T. P., Paduano, C. Q., Stokol, T., Southard, T. L., Nishimura, N., Skoda, R. C., ... & Schaffer, C. B. (2014). Stalled cerebral capillary blood flow in mouse models of essential thrombocythemia and polycythemia vera revealed by in vivo two-photon imaging. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(12), 2120-2130.

Sevik Evren Erdener , Tang J, Sajjadi A, Kılıç K, Kura S, Schaffer CB, Boas DA. Spatio-temporal dynamics of cerebral capillary segments with stalling red blood cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 May;39(5):886-900.

Seonjoo Lee, et al. "White matter hyperintensities are a core feature of Alzheimer's disease: evidence from the dominantly inherited Alzheimer network." *Annals of neurology* 79.6 (2016): 929-939.

Sigler, A., & Murphy, T. H. (2010). In vivo 2-photon imaging of fine structure in the rodent brain: before, during, and after stroke. *Stroke*, 41(10_suppl_1), S117-S123.

Skaar, J. (2006). Fresnel equations and the refractive index of active media. *Physical Review E*, 73(2), 026605.

Srinivasan, Vivek J., et al. "Multiparametric, longitudinal optical coherence tomography imaging reveals acute injury and chronic recovery in experimental ischemic stroke." *PloS one* 8.8 (2013): e71478.

Stosiek C., O. Garaschuk, K. Holthoff, and A. Konnerth, "In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 12, pp. 7319–7324, 2003.

Sylvain Gigan et al. "Roadmap on wavefront shaping and deep imaging in complex media." *Journal of Physics: Photonics* 4.4 (2022): 042501.

Tam Nhan, Burgess, A., Cho, E. E., Stefanovic, B., Lilge, L., & Hynynen, K. (2013). Drug delivery to the brain by focused ultrasound induced blood–brain barrier disruption: Quantitative evaluation of enhanced permeability of cerebral vasculature using two-photon microscopy. *Journal of Controlled Release*, 172(1), 274-280.

T.P. Santisakultarm, Paduano, CQ, Stokol, T, Southard, TL, Nishimura, N, Skoda, RC, Olbricht, WL, Schafer, AI, Silver, RT, Schaffer, CB. Stalled cerebral capillary blood flow in mouse models of essential thrombocythemia and polycythemia vera revealed by in vivo two-photon imaging. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 2120– 30.

Tony Wilson. "Resolution and optical sectioning in the confocal microscope." *Journal of microscopy* 244.2 (2011): 113-121.

Vivien Labat-Gest, and Simone Tomasi. "Photothrombotic ischemia: a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 76 (2013): e50370.

Waqar Ahmad, Ijaz B, Shabbiri K, Ahmed F, Rehman S. Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: mechanisms behind ROS/RNS generation. *Journal of Biomedical Science*. 2017. ;24(1):1-0.

William I. Rosenblum, El-Sabban F. Platelet aggregation in the cerebral microcirculation: effect of aspirin and other agents. *Circ Res*. 1977 Mar;40(3):320-8.

Winfried Denk., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73-76.

Yasser Iturria-Medina, et al. "Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis." *Nature communications* 7.1 (2016): 11934.

Yan-Jie Zhao, et al. "Skull optical clearing window for in vivo imaging of the mouse cortex at synaptic resolution." *Light: Science & Applications* 7.2 (2018): 17153-17153.

Yoon JH, Shin P, Joo J, Kim GS, Oh WY, Jeong Y. Increased capillary stalling is associated with endothelial glycocalyx loss in subcortical vascular dementia. *BioRxiv*. 2020. Jan 1.

Yorito Hattori, et al. "Gradual carotid artery stenosis in mice closely replicates hypoperfusive vascular dementia in humans." *Journal of the American Heart Association* 5.2 (2016): e002757.

Yuankang Lu, Xuecong Lu, Cong Zhang, Paul-James Marchand, Frédéric Lesage, "Longitudinal optical coherence tomography imaging of tissue repair and microvasculature regeneration and function after targeted cerebral ischemia," *J. Biomed. Opt.* 25(4) 046002

Yutaka Tomita, et al. "Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 25.7 (2005): 858-867.

Zeno Földes-Papp, Ulrike Demel, and Gernot P. Tilz. "Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview." *International immunopharmacology* 3.13-14 (2003): 1715-1729.

ANNEXE

ANNEXE : PROCÉDURE D'ALIGNEMENT DU MICROSCOPE PAR RÉFLECTANCE CONFOCAL

1. Enlever toutes les lentilles du système.
2. Vérifier l'angle du miroir en coin. Le mettre la pointe vers le bras perpendiculaire et la base parallèle possible au trajet optique.
3. Aligner le bras d'excitation (De la source à l'objectif de microscopie).
4. Aligner le bras de détection transversal.
 1. Injecter la fibre source dans le collimateur et aligner jusqu'à l'objectif
 2. Note : tourner la polarisation avant le cube de séparation de polarisation.
5. Superposer les trajets optiques mentionnés ci-haut.
 1. Utiliser une fibre de séparation lumineuse pour injecter dans le collimateur et l'élargisseur de faisceau source.
 2. Note : ne pas toucher au trajet de la source, seulement le trajet de détection.
6. Placer les lentilles dans le bras de détection transversale.
7. Trouver le diamètre minimal du faisceau avec le miroir en coin. Utiliser la méthode 'knife-edge' afin d'observer l'effet de Foucault.
8. Prendre en note la position optimale pour couper le faisceau en deux.
 1. Noter les valeurs sur la plateforme 2D sous le miroir en coin.
9. Retirer les lentilles et couper le faisceau en 2. Déplacer le prisme diagonalement avec la plateforme 2D. Noter le déplacement fait.
10. Aligner le bras perpendiculaire sur le trajet d'excitation.
11. Remettre le prisme en position optimale.
12. Remettre toutes les lentilles dans les bras de détection.
13. Voir si l'effet de Foucault est visible dans les deux bras en bougeant le prisme.
14. Faire ajustements fins avec USAF 1951 sous l'objectif.
 1. Insérer les fibres de détection, replacer la fibre source sans séparation lumineuse.
 2. Utiliser le programme de l'imagerie continue du microscope et ajuster jusqu'à observer l'effet du contraste de phase.