

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉTERMINATION DE L'ACTIVATION NEURONALE DANS LA MOELLE
ÉPINIÈRE PAR IMAGERIE INTRINSÈQUE

NICOLAS BRIEU
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

MAI 2008



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-46038-2
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-46038-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉTERMINATION DE L'ACTIVATION NEURONALE DANS LA MOELLE
ÉPINIÈRE PAR IMAGERIE INTRINSÈQUE

présenté par: BRIEU Nicolas

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

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

M. SAVARD Pierre, Ph.D., président

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

M. HOGUE Rick, Ph.D., membre

Je dédicace ce travail à mes parents, qui m'ont soutenu à travers toutes les premières étapes de la vie, et à Susanne qui m'encourage chaque jour à devenir meilleur.

REMERCIEMENTS

Ce mémoire rassemble le travail effectué à l'Ecole Polytechnique de Montréal et à l'Hôpital du Sacré Coeur de Montréal sous la tutelle de Frédéric Lesage qui m'a soutenu par ses conseils et ses encouragements.

J'aimerais aussi remercier Eric Beaumont dont les compétences chirurgicales m'ont permises de réaliser des expériences in vivo et Simon Dubeau qui continue de travailler sur ce projet.

Je remercie dans le plus complet désordre toutes les personnes avec qui j'ai partagé un coin de labo ces 18 derniers mois : Marie, Aurélie, Michelle, Louis, Carl, Matthieu, Jean, les deux Nico(s) et les deux Simon(s).

RÉSUMÉ

Les techniques d'imagerie intrinsèque ont déjà permis d'établir des cartes précises de l'activité neuronale du cortex de petits animaux grâce à l'enregistrement de la réponse hémodynamique. Leurs hautes résolutions spatiale et temporelle en font les outils idéaux pour étudier le couplage entre la réponse vasculaire et la réponse neuronale. Cependant, les études existantes sur ce sujet n'ont pas été appliquées à l'ensemble du système nerveux central, la moelle épinière n'ayant fait l'objet que d'un nombre très restreint de publications. Les difficultés physiologiques apparentes, comme les différences d'organisation entre le cortex et la moelle, ou les mouvements plus conséquents causés par la respiration, rendent l'imagerie intrinsèque de cette zone plus délicate.

Ce mémoire propose d'appliquer deux des méthodes d'imagerie intrinsèque pour enregistrer la réponse hémodynamique dans la moelle épinière du rat. L'imagerie optique intrinsèque consiste à éclairer la zone d'intérêt par une lumière absorbée différenciellement par le sang oxygéné et par le sang deoxygéné, puis à enregistrer les variations de la réflectance qui est liée à la concentration des chromophores. Séparément, l'analyse statistique des cartes de speckle issues de l'éclairement de la région par une lumière cohérente permet de déterminer la distribution des vitesses au sein de l'image. Les évolutions temporelles et la localisation des variations des concentrations et de la vitesse, mises en relief par des méthodes de traitement du signal, caractérisent alors la réponse hémodynamique.

La conduite d'expériences *in vivo* sur des rats nous a permis de valider la stabilité de notre système d'acquisition, puis de mener une étude de groupe afin d'étudier les caractéristiques reproductibles de la réponse. Enfin, la comparaison avec un groupe de rats ayant subi une section complète de la moelle a mis en évidence les changements vasculaires et neuronaux subséquents.

ABSTRACT

The intrinsic imaging techniques have already managed to establish accurate maps of the neuronal activity in the cortex of small animals by recording the hemodynamic response. The high spatial and temporal resolutions of these methods make them the ideal tools for studying the coupling between the vascular and the neural responses. However, these studies have not been applied to the whole central nervous system, as the spinal cord has only been studied by a limited number of publications. The physiological problems, such as the different organization of the cortex and of the spinal cord, or the increased movements caused by respiration, make the imaging of this area more complex.

This thesis aims at applying two of the intrinsic imaging methods in order to record the hemodynamic response in the rat lumbar spinal cord. Intrinsic optical imaging consists in illuminating the region of interest by visible light, which is differentially absorbed by the oxygenated and the deoxygenated blood, and in recording the evolution of the absorbance, which is linked to the concentration of the chromophores. In addition, the statistical analysis of the speckle maps, originated from the illumination of the area with a coherent light produced by a laser, leads to the determination of the blood flow distribution over the image. The temporal evolution and the localization of the variations in concentration or in velocity, highlighted by signal processing techniques, consequently characterize the hemodynamic response.

In vivo experiences were conducted to check the viability of our acquisition system and a group study was carried out to study the reproducible characteristics of the response. Finally, the comparison with a group of rats, whose spinal cord was previously sectioned, pointed out some subsequent vascular and neuronal consequences.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	iv
REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ	vi
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES NOTATIONS ET DES SYMBOLES	xxi
LISTE DES TABLEAUX	xxiv
LISTE DES ANNEXES	xxv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 PRINCIPES PHYSIOLOGIQUES	4
1.1 Couplage entre activité neuronale et réponse hémodynamique	4
1.1.1 Composantes de la réponse hémodynamique	4
1.1.1.1 Composante nerveuse	4
1.1.1.2 Evolution des concentrations et du débit sanguin	6
1.1.2 Nature du couplage	11
1.2 Organisation neuronale de la moelle épinière	12
1.2.1 Organisation générale	12
1.2.2 Description des voies réflexes	13
1.2.3 Profondeur supposée de l'activation	15

1.2.4	Localisation attendue de l'activation	16
1.2.5	Les différents types de fibres nerveuses	16
CHAPITRE 2	PRINCIPES PHYSIQUES DE L'IMAGERIE INTRINSÈQUE	19
2.1	Imagerie optique et mesure de concentrations	19
2.2	Imagerie par speckle et mesure de la vitesse	24
2.2.1	Origines physiques d'un champ de speckle	24
2.2.2	Calcul de la vitesse des particules	26
2.2.2.1	Relation entre la vitesse et le contraste	26
2.2.2.2	Calcul du contraste	28
2.2.3	Influence des paramètres d'acquisition	31
2.2.3.1	Taille du speckle et résolution optique	31
2.2.3.2	Influence du temps d'exposition de la caméra	32
CHAPITRE 3	INSTRUMENTATION ET PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	35
3.1	Protocole chirurgical	35
3.2	Instrumentation	37
3.3	Manipulation du système	41
3.4	Protocole de stimulation	42
3.5	Influence du choix de l'anesthésiant	43
CHAPITRE 4	ANALYSE SPATIOTEMPORELLE DES DONNÉES	46
4.1	Mise en évidence du problème	46
4.2	Analyse des données en stimulation par blocs	48
4.2.1	Première étape : calcul des matrices d'absorbance et de vitesse .	48
4.2.2	Deuxième étape : traitement des matrices des variations	52
4.2.2.1	Méthode simple par filtrage	53
4.2.2.1.1	Caractéristiques temporelles	53
4.2.2.1.2	Caractéristiques spatiales	53

4.2.2.2	Méthodes d'estimation de sources	56
4.2.2.2.1	Analyse en composantes principales	57
4.2.2.2.2	Analyse en composantes indépendantes	59
4.2.2.2.3	Projection des composantes	62
4.3	Analyse des données en stimulation continue	62
4.3.1	Principe	62
4.3.2	Spectre de Fourier	64
4.3.3	Images de phase et d'amplitude	64
CHAPITRE 5	VALIDATION DU SYSTÈME ET RÉSULTATS INITIAUX	66
5.1	Validation du système	66
5.1.1	Test du système d'imagerie optique	66
5.1.2	Test du système d'imagerie par analyse du speckle	67
5.2	Etude préliminaire	70
5.2.1	Exemple de résultats	71
5.2.1.1	Stimulation par blocs	71
5.2.1.2	Stimulation continue	77
5.2.2	Comparaison des deux techniques	78
5.2.3	Conclusions de l'étude préliminaire	79
CHAPITRE 6	ARTICLE 1 : CHARACTERIZATION OF THE HEMODYNAMIC AND METABOLIC RESPONSE IN THE IN VIVO RAT LUMBAR SPINAL CORD BY INTRINSIC IMAGING	82
6.1	Abstract	83
6.2	Introduction	83
6.3	Material and methods	86
6.3.1	Surgical procedure	86
6.3.2	Material	87
6.3.3	Stimulation protocol	88

6.3.4	Optical imaging analysis	88
6.3.5	Speckle imaging analysis	90
6.3.6	Signal processing	91
6.4	Results	91
6.4.1	Single wavelength imaging	91
6.4.2	Complete hemodynamic response	95
6.5	Discussion	100
6.5.1	Hemodynamic of the spinal cord	101
6.5.2	Validation	103
6.6	Conclusion	105
6.7	Acknowledgments	105
CHAPITRE 7	CONSÉQUENCES D'UNE SECTION SUPÉRIEURE DE LA MOELLE	106
7.1	Protocole chirurgical	106
7.2	Conséquences sur la concentration en HbR	107
7.3	Conséquences sur la vitesse	109
7.4	Interprétation	109
CHAPITRE 8	DISCUSSION GÉNÉRALE	112
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		115
RÉFÉRENCES		116
ANNEXES		125

LISTE DES FIGURES

FIG. 1.1	La figure (a) indique les relations entre les neurones, les astrocytes et les capillaires sanguins. La figure (b) résume les étapes conduisant à la consommation de glucose et d'oxygène suite à l'arrivée d'un potentiel d'action à l'extrémité d'un neurone post-synaptique, ainsi que le rôle de l'astrocyte. Ces deux figures sont tirées de Magistretti (1999).	7
FIG. 1.2	Structure de la molécule d'hémoglobine Sheffield (2008). On distingue les quatre sous-entités (α_1 , α_2 , β_1 et β_2), les quatre groupes "heme", ainsi que l'ion Fe^{2+} où se lie la molécule de dioxygène. Tirée de (Sheffield, 2008).	8
FIG. 1.3	La figure (a) représente la première mise en évidence d'une réponse morphologique par Sherrington dans Roy and Sherrington (1890). L'oncographe y représente une mesure de la variation de la taille du cortex, et le kymographe les variations de la pression systémique. La figure (b) décrit l'évolution typique des concentrations en HbR, HbO et $\text{HbT} = \text{HbO} + \text{HbR}$ lors d'une réponse neuronale Dunn et al. (2005).	10
FIG. 1.4	Couplage de l'intensité de la réponse hémodynamique en fonction de l'activité neuronale mesurée par électrophysiologie (a) (Hewson-Stoate et al., 2005), de la fréquence (b) (Sheth et al., 2003), et de l'intensité de la stimulation (c) (Sasaki et al., 2002).	12
FIG. 1.5	Descriptions anatomiques de la moelle épinière (a) et du cortex (b) permettant de mettre en évidence l'inversion entre la matière blanche et la matière grise. Tirées de (Sheffield, 2008)	13

FIG. 1.6	Connexions neuronales intervenant dans les arcs réflexes polysynaptique (a) et motatique (b). Dans (a), 1 est le nerf spinal, 2 le ganglion spinal, 3 la racine dorsale sensitive, 4 un ou plusieurs interneurons et 5 la racine ventrale motrice (Boutillier and Outrequin, 2007).	14
FIG. 1.7	Localisation de l'activation enregistrée par fMRI après stimulation de la patte arrière droite. Tirée de Lawrence et al. (2004). .	16
FIG. 1.8	A gauche : enregistrement par électrophysiologie des potentiels d'action dans les racines nerveuses de la région L4-L5 de la moelle épinière après stimulation électrique du nerf sciatique du rat. A droite : variation des amplitudes de ces potentiels selon la force de la stimulation. Tirées de Chang and Shyu (2001). . . .	18
FIG. 2.1	(a) Profil de sensibilité obtenu en imagerie optique (Hillman et al., 2007). (b) Spectre d'absorption de l'eau : évolution du coefficient molaire d'extinction ($en mol.L^{-1}$) en fonction de la longueur d'onde (en nm). Les coefficients d'absorption (α) sont tirés de H. Buiteveld and J. M. H. Harkvoort and M. Donze, "The optical proprieties of pure water" in SPIE proceeding on Ocean Optics XII", 1994, puis convertis en coefficients molaires d'extinction. L'axe des ordonnées est en échelle logarithmique. . . .	20
FIG. 2.2	(a) Spectre d'absorption de HbR et HbT : évolution du coefficient molaire d'extinction ϵ (en $mol.L^{-1}$) des deux molécules en fonction de la longueur d'onde (en nm). (b) Rapport entre ϵ_{HbR} et ϵ_{HbO} . Les données sont tirées du travail de Scott Prahl exposé sur le site du Oregon Medical Laser Center, http://omlc.ogi.edu/	21
FIG. 2.3	(a) Champ de speckle. (b) Principe des interférences créées par les ondes réfléchies sur une surface granulée (Goodman (1984)). (c) Histogramme du champ de speckle.	26

FIG. 2.4	(a) Evolution du contraste K en fonction du temps de corrélation t_c pour $T = 10$ ms et τ_c variant entre 0 et 0.35. (b) Effet sur la courbe d'un échantillonnage non linéaire de l'axe des abscisses.	29
FIG. 2.5	Images de contraste obtenues selon la méthode spatiale (a) et temporelle (b) sur un cortex de chat. Données acquises dans le laboratoire de C. Casanova avec la collaboration de Matthieu Vani.	31
FIG. 2.6	Intensité lumineuse I d'une tache de Airy en fonction de la distance au centre Z . La sous-figure en haut à droite représente son apparence. Figures tirées de Smith (2000).	32
FIG. 2.7	Influence du temps d'exposition sur l'amplitude du pic de sensibilité en théorie (a), et en pratique (b). Pour $T \leq 2$ ms, la sensibilité baisse énormément alors qu'elle est quasiment constante pour $T \geq 5$ ms. Les figures sont tirées de Yuan et al. (2005).	33
FIG. 3.1	(a) Photographie du montage sur laquelle on peut apercevoir la diode d'illumination, la caméra CCD, la lentille macroscopique, et le stimulateur électrique situé sur la patte gauche de l'animal. (b) Photographie de la vue dans le microscope de la préparation chirurgicale de la moelle. On distingue deux des clampes de fixation. (c) Schéma simplifié du montage utilisé.	37
FIG. 3.2	(a) Réponse spectrale de la caméra utilisée, figure tirée de la notice d'utilisation. (b) Spectre relatif d'émission pour le vert (en vert), le jaune (en bleu) et le rouge (en rouge). L'axe des abscisses représente la longueur d'onde en nm.	38
FIG. 3.3	Modification des caractéristiques de la réponse hémodynamique suite à l'injection d'uréthane (Martin, 2006) : diminution de l'amplitude (a) et non linéarité du couplage neuro-métabolique (b).	45
FIG. 4.1	Ensemble de la chaîne d'analyse par blocs des données.	49

FIG. 4.2	Calcul de la corrélation croisée pour retrouver le décalage temporel entre X et Y.	55
FIG. 4.3	Calcul de la corrélation croisée pour retrouver le décalage temporel au sein d'une image.	56
FIG. 5.1	Test du système d'imagerie optique. (a) Images de la diode sans atténuateur optique. (b) Carte des variations enregistrées. (c) Résultat obtenu après traitement morphologique.	67
FIG. 5.2	(a) Photo du catheter sous lumière blanche. (b) Images brutes de speckle pour un flot nul ou égal à 1 mm.s^{-1} . (b) et (c) Cartes des vitesses correspondantes obtenues à partir du calcul du contraste spatial (c) ou du contraste temporel (d).	68
FIG. 5.3	Images de contraste spatial (5x5) avant (a) et après (b) grattage du dos de la main. (c) Carte des variations relatives.	69
FIG. 5.4	(a) Image de speckle résultante de l'illumination de la moelle par un laser. (b) Image de contraste spatial calculée pour une fenêtre de 5×5 pixels. (c) Image de vitesses construite par inversion de la relation entre le contraste et la vitesse selon l'équation (2.14).	70
FIG. 5.5	(a) Image de contraste temporel construite à partir de dix images brutes. (b) Image de vitesse calculée avec un échantillonnage linéaire du contraste lors de l'inversion de l'équation (2.14). (c) Même image calculée avec un échantillonnage logarithmique. (d) Résultat de la segmentation superposé à l'image anatomique de la moelle épinière.	71
FIG. 5.6	Décours temporel filtré de la réflectance $\frac{I-I_0}{I_0}$ (a) moyennée sur une zone sélectionnée dans la veine centrale (b). (c) représente la FFT de ces variations.	73

FIG. 5.7	Décours temporel filtré de la réflectance $\frac{I-I_0}{I_0}$ (a) moyennée sur une zone latérale (b) de la moelle correspondant à une activation. (c) représente la FFT de la réponse hémodynamique estimée.	73
FIG. 5.8	Evolution spatio-temporelle de la réflectance $\frac{I-I_0}{I_0}$ pour des valeurs supérieures à 10^6 et pour un temps post stimulus compris entre 0 et 14 s.	74
FIG. 5.9	(a) Carte de corrélation croisée dont la couleur code l'échelle temporelle, et l'intensité le maximum de la corrélation croisée entre le décours de la figure 5.7 et le décours temporel en chaque point. (b) Carte des coefficients de corrélation simple entre ce même décours et le décours temporel en chaque point.	75
FIG. 5.10	(a) Décours brut des variations de réflectance dans la ROI. (b) Même décours après filtrage de Chebishev. (c) Localisation spatiale du pic initial. Les variations inférieures à -4.10^{-7} sont affichées en superposition de l'image anatomique.	76
FIG. 5.11	(a) et (b) Première composante initiale déterminée par ICP. (c) et (d) Résultat de la suppression de cette composante sur le décours temporel dans la ROI.	77
FIG. 5.12	(a) Amplitude du spectre de Fourier estimé. Les cercles en rouge sont les pics correspondant au harmoniques de la réponse hémodynamique. (b) Transformée de Fourier inverse calculée à partir des pics sélectionnés précédemment.	78
FIG. 5.13	Images représentant en chaque point l'amplitude (a) et la phase convertie en secondes (b) de la transformée de Fourier prise à la fréquence de stimulation (0.1562 Hz). (c) Segmentation et identification de la zone d'activation par sélection de la phase ($0 < t < 2.30$).	79

FIG. 6.1	(A) Photography of the surgical exposure of the cord.(B) Experimental setup for the optical intrinsic imaging of the spinal cord during electrical sciatic stimulation.	87
FIG. 6.2	(A) Spectral evolution of the HbR and the HbO extinction coefficients, in mol.L ⁻¹ , between 450nm and 950nm. (B) Evolution of their ratio. The dotted line indicates its value for the wavelength used for the functional imaging.	88
FIG. 6.3	(A) Evolution of the maximum absolute variation for each intensity. Bars stand for the maximum value of the normalized variations $\left -\ln \frac{I}{I_0} \right $. Error bars represent the standard deviation over the trials for each intensity. Mean and standard deviation for 8× threshold are respectively 1 and 0, since it was the normalization reference. The red curve was obtained by a polynomial curve fitting M_1 . (B) Average temporal variations of $-\ln \frac{I}{I_0}$ for the four intensities (4×, 6×, 8×, and 12× threshold) under a red illumination. (C) Average temporal variations of $\frac{\nu - \nu_0}{\nu_0}$ for three of the intensities (4×, 8×, and 12× threshold) using the speckle imaging method. The variations are averaged for a group of three animals.	94

- FIG. 6.4 (A) Spatiotemporal optical response on the dorsal spinal cord after a sciatic nerve stimulation (10Hz, 10ms, 0.09mA). Variations of ΔA thresholded by $0.5 \times$ the minimum are plotted on the anatomic image. This threshold is represented by the dotted line in (B). (B) Average variations of $-\ln \frac{I}{I_0}$ over the Region Of Interest (ROI) specified by the white rectangle in the anatomical image. The gray bar indicates the stimulation period. (C and D) Temporal map of activation by using the maximum (C) and the cross correlation (D) methods. The two colorbars represent the relative time (in s) to the stimulation onset and to the maximum of the averaged signal in the ROI. 95
- FIG. 6.5 (A-B-C) Spatio-temporal evolution with a 1s interval of ΔHbO (A), ΔHbR (B) and ΔHbT (C) following a 1s sciatic stimulation. Responses higher than 0.5 times the maximum variation in the selected ROI are shown superimposed on the anatomic image. Vascular compartments are clearly visible given that they integrate the response from a large area. (D) Evolution of the relative concentrations in HbO, HbR, and HbT over the selected ROI. (E) and (F) Spatio temporal evolution of the relative changes in blood velocity, and the corresponding time course. 97
- FIG. 6.6 (A) Time courses of the HbO, HbR, HbT and BF changes from baseline, and estimation of the CMRO_2 for $\gamma_R = 0.5$ and $\gamma_T = 0.5$. (B) The dependence of the estimated CMRO_2 on the values of γ_R and γ_T (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5 and 2). 98

FIG. 6.7	Electrophysiological measure of the neuronal activation in the spinal cord consecutive to a 1ms stimulation of $8\times$ or $12\times$ threshold (dash line). The stimulation artefact is encircled and occurs at $t_0 = 21.5\text{ms}$. On the right, the values of the second maximums are plotted against the intensity of the stimulation.	99
FIG. 6.8	For HbR, HbO, HbT and BF, the surfaces of activations are made with the pixels whose value at t_{max} is higher than $0.75 \times$ the maximum of the variation in the ROI. The last image represents the pixels that satisfy 3 of these 4 conditions.	100
FIG. 7.1	(a) Variations entre 0 et 4 s de l'absorbance après une stimulation de 0.06 mA pour $\lambda = 637\text{ nm}$, dans le cas d'un rat lésé (R29E24). (b) Décours temporel correspondant pour t variant de -3 à 7 s. (c) Carte de corrélation ($C > 0.9$) superposée à l'image anatomique. (d) Décours temporels normalisés selon leur maximum pour les expériences considérées. La moyenne des décours est tracée en rouge.	108
FIG. 7.2	Vascularisation de la moelle épinière par les artères spinales antérieure et postérieure (a) connectées à l'aorte par les veines intercostales thoraciques (b)(Lamin and Bhattacharya, 2003).	110
FIG. I.1	Tableau récapitulatif des expériences menées d'août à Décembre 2007. Les cases jaunes indiquent les expériences ayant données de bons résultats, les cases rouges celles pour lesquels aucun résultat n'a été obtenu.	126
FIG. I.2	Tableau récapitulatif des expériences menées d'août à Décembre 2007. Les cases jaunes indiquent les expériences ayant données de bons résultats, les cases rouges celles pour lesquels aucun résultat n'a été obtenu.	127

FIG. II.1	Tableau récapitulatif des paramètres physiologiques enregistrés lors des expériences. Les points d'interrogation correspondent à des paramètres non connus.	129
FIG. II.2	Tableau récapitulatif des paramètres physiologiques enregistrés lors des expériences. Les points d'interrogation correspondent à des paramètres non connus.	130
FIG. II.3	Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors des expériences.	131
FIG. II.4	Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors des expériences.	132

LISTE DES NOTATIONS ET DES SYMBOLES

ABBREVIATIONS

<i>ACP</i>	Analyse en composantes principales.
<i>ATP</i>	Adénosine Tri Phosphate.
<i>BF</i>	Blood Flow, pour flot sanguin.
<i>BV</i>	Blood Volume, pour volume sanguin.
<i>ECG</i>	Electro-encéphalographie.
<i>HbO</i>	Hémoglobine oxygénée.
<i>HbR</i>	Hémoglobine deoxygénée ou réduite.
<i>HbT</i>	Hémoglobine totale, formée par l'ensemble de HbR et de HbO.
<i>ICP</i>	Analyse en composantes indépendantes.
<i>ISOI</i>	Imagerie des Signaux Optiques Intrinsèques.
<i>IRMf</i>	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle.
<i>NIRSI</i>	Near-Infrared Spectroscopic imaging, pour Imagerie spectroscopique proche infra-rouge.
<i>PDC</i>	Profondeur de champ.
<i>PET</i>	Positron Emission Tomography, pour Tomographie par émission de positron.

NOTATIONS

a	Dans le contexte du speckle, constante physique du milieu.
A	Selon le contexte, absorbance du milieu ou matrice de mélange.
A_{ij}	Amplitude incidente d'une onde j .
$\alpha(\lambda)$	Coefficient d'absorption du milieu pour la longueur d'onde λ .
b	Vecteur de bruit.
C	Concentration
C_{ij}	Coefficient de corrélation au point (i, j) .

ΔX	Variation de la variable X par rapport à sa valeur initiale X_0 . $\Delta X = X - X_0$.
$\epsilon_X(\lambda)$	Coefficient molaire d'extinction pour l'espèce X et une longueur d'onde λ .
e	Diamètre du cercle de netteté.
f	Selon le contexte, la fréquence ou la longueur focale.
f_c	Fréquence de coupure.
f_e	Fréquence d'échantillonnage.
$f/\#$	Ouverture de la caméra.
g	Grandissement.
H	Selon le contexte, distance hyperfocale ou entropie.
$I(\lambda, t, x)$	Intensité lumineuse enregistrée au temps t, suite à la propagation d'une onde de longueur d'onde λ dans un milieu de longueur x.
I_R	Intensité lumineuse réfléchie.
I_0	Intensité lumineuse incidente.
I_r	Variations relatives d'intensité.
I_a	Variations absolues d'intensité.
k_0	Nombre d'onde.
$K_S(i, j)$	Contraste spatial calculé au point de coordonnées(i, j).
$K_T(i, j)$	Contraste temporel calculé au point de coordonnées(i, j).
λ	Longueur d'onde.
Φ_j	Phase d'une onde j.
p	Selon le contexte, la probabilité associée à un événement ou la distance de mise au point.
p_p	Profondeur de pénétration.
σ	Ecart type.

S_r	Sensibilité relative.
S	Matrices des sources.
T	Selon le contexte, soit le Threshold musculaire, soit le temps d'exposition de la caméra CCD.
T_e	Période d'échantillonnage.
t_p	Taille du pixel.
τ_c	Temps de corrélation.
ν	Vitesse moyenne des particules.
U_k	kième composante principales.
W	Matrice de séparation.
x_a	Distance moyenne parcourue par les photons dans le milieu.
X	Matrice des observations.

OPérateurs

$C_t(X)$	Fonction d'auto-corrélation.
$cov(X)$	Covariance de X.
$E[X]$	Moyenne de X.
Γ_{XY}	Corrélation croisée des signaux X et Y.
$\Psi(X)$	Matrice de covariance.
$\langle X \rangle$	Lorsque X est une matrice, valeur moyenne de X.
$\langle X \rangle_t$	Lorsque X est une variation temporelle, valeur moyenne de X.
$\langle X, Y \rangle$	Produit scalaire entre X et Y.
$\hat{X}$	Estimée de la variable X.
$Var(X)$	Variance d'un vecteur X.
$\mathfrak{S}(X)$	Mesure d'indépendance de X.
$J(X)$	Négentropie de X.
$TF(X)$	Transformée de Fourier de X.

LISTE DES TABLEAUX

TAB. 6.1	Probabilities associated with the t-Student tests.	93
TAB. 6.2	Surface and length of the spatial extent of the activation.	100

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I	TABLEAUX RÉCAPITULATIFS DES EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES	125
ANNEXE II	TABLEAUX RÉCAPITUALTIFS DES EXPÉRIENCES (RATS SAINS ET LÉSÉS)	128

INTRODUCTION

L'imagerie médicale permet aussi bien d'identifier l'organisation structurale des tissus biologiques grâce aux modalités d'imagerie anatomique, que de mieux comprendre certains mécanismes physiologiques. On parle dans ce cas d'imagerie fonctionnelle. L'imagerie par résonance magnétique (IRMf), la tomographie par émission de positron (PET), l'électro-encéphalographie (ECG), la magnéto-encéphalographie (MEG), l'imagerie spectroscopique proche infra-rouge (NIRSI) et enfin l'imagerie optique intrinsèque (IOI) sont les principales modalités existant actuellement dans ce domaine.

L'IOI, comme l'IRMf et le NIRSI, permet de déterminer la force et la localisation de l'activation neuronale dans les tissus neuronaux grâce à la mesure de la réponse hémodynamique. Elle possède de plus des avantages propres : un faible coût opérationnel et une simplicité de conception, des résolutions spatiales et temporelles élevées comprises respectivement entre 10 et 50 μm et entre 100 ms et 500 ms, une durée d'acquisition courte de seulement 10 à 15 minutes, l'absence d'injection de produit de contraste, et enfin le fait qu'aucun contact avec le tissu étudié n'est nécessaire pendant l'acquisition. Néanmoins, cette technique présente aussi certaines limites. La nécessité d'exposer par chirurgie les tissus d'intérêt rend son utilisation chez l'homme peu vraisemblable et limite son application à des études animales. L'interprétation des résultats est limitée par l'impossibilité de construire des cartes tri-dimensionnelles de l'activation. De plus, puisque son interprétation se base sur les variations des caractéristiques optiques du milieu et non directement sur l'activité neuronale, on accède à une mesure indirecte du signal. En conséquence, il faut concevoir cette méthode d'imagerie non pas comme une technique clinique mais comme un outil de recherche permettant de mieux comprendre le fonctionnement du système nerveux central. C'est justement l'objectif de cette étude.

L'imagerie optique intrinsèque est basée sur la mesure des variations de la réflectance des

tissus neuronaux qui permet de déterminer les variations locales du volume et du degré d'oxygénation du sang. Le problème consiste à relier ces variations, consécutives à la réponse hémodynamique, avec l'intensité effective de la réponse neuronale, en montrant par exemple une corrélation entre l'amplitude de la stimulation, l'intensité de la réponse neuronale mesurée ponctuellement par électrophysiologie, et les caractéristiques de la réponse hémodynamique estimée aussi bien en amplitude qu'en durée. Ces travaux ont déjà été réalisés dans le cortex mais peu de littérature est présente pour confirmer que les mêmes règles régissent le fonctionnement neuronal de la moelle.

La problématique à l'origine de ce travail est de montrer que l'imagerie optique intrinsèque est applicable à l'étude de la moelle épinière. Les hypothèses de recherche sous-jacentes sont :

- La réponse hémodynamique de la moelle épinière peut être mesurée par imagerie intrinsèque permettant ainsi de former des cartes spatiales de l'activation neuronale.
- La sensibilité de l'imagerie intrinsèque est égale ou supérieure à ses équivalents fMRI.
- Lors d'une stimulation périphérique du nerf sciatique, l'activation sera observée ipsi-latéralement dans la région L3-L6 de la moelle.
- L'activation dans la moelle épinière de rats ayant subi une lésion sera supérieure à celle des rats sains.

Le mandat proposé se décline en quatre étapes principales :

- Mettre en oeuvre l'appareillage nécessaire aux mesures, construire l'ensemble de la chaîne d'acquisition et de traitement des données et déterminer les paramètres d'acquisition adaptés à ce type d'imagerie,
- Confirmer la viabilité du système par des tests *in vitro* et *in vivo*,
- Appliquer le système à l'imagerie de petits animaux en vue d'établir un ensemble de paramètres permettant d'assurer une stabilité des résultats,

- Confirmer sur un nombre de rats plus important la stabilité des résultats avec ces paramètres puis étudier les conséquences d'une section complète de la moelle épinière.

Les contributions décrites dans ce travail ont fait l'objet d'une présentation d'un poster ("Intrinsic Optical Imaging of the Rat Lumbar Spinal Cord") au congrès "Optical Society of America" (OSA) qui s'est tenu en mars 2008 à St-Pétersburg, Floride, USA ; et d'un article scientifique soumis à NeuroImage en mai 2008 sous le nom "Characterization of the hemodynamic and metabolic response response in the in vivo rat lumbar spinal cord by intrinsic imaging", et présenté au chapitre 6 de ce mémoire.

Ce travail présentera tout d'abord l'origine et les caractéristiques de la réponse hémodynamique, détaillera comment l'imagerie intrinsèque permet de déterminer les évolutions des concentrations et de la vitesse sanguine rattachées à cette réponse, et explicitera le choix consécutif de l'instrumentation utilisée et les méthodes d'analyse des données enregistrées. Enfin, la présentation des résultats obtenus et la discussion permettront de répondre à la problématique énoncée et de conclure sur la possibilité d'enregistrer les conséquences vasculaires de l'activation neuronale au niveau de la moelle épinière.

CHAPITRE 1

PRINCIPES PHYSIOLOGIQUES

1.1 Couplage entre activité neuronale et réponse hémodynamique

L'existence d'un lien entre l'activité neuronale et la modification de propriétés physiologiques a été pour la première fois énoncée par Roy and Sherrington (1890). Ils constatèrent que la stimulation électrique de n'importe quel nerf sensitif chez le chien entraîne une expansion du cortex, une dilatation des vaisseaux sanguins, et une augmentation de la pression artérielle systémique comme le montre la figure 1.3. Cette réaction commence immédiatement après la stimulation et se prolonge pendant quelques secondes avant que le cortex ne reprenne sa taille initiale. Plus récemment, de nombreux travaux ont démontré que l'activation neuronale implique une augmentation du flux sanguin et une modification du volume et de la concentration sanguine en oxygène. Ces changements sont observés à la fois dans le cortex et dans la moelle. Ce couplage neurovasculaire est nommé **la réponse hémodynamique**. Nous allons tout d'abord décrire son origine physiologique, puis expliciter le couplage existant entre cette réponse et l'activité neuronale.

1.1.1 Composantes de la réponse hémodynamique

1.1.1.1 Composante nerveuse

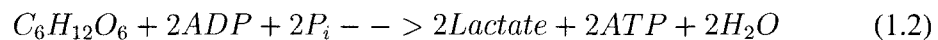
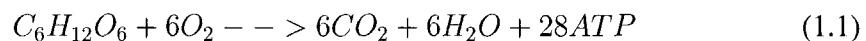
L'influx nerveux est transmis sous la forme de potentiels d'action, acheminés à travers les neurones depuis les dendrites jusqu'à la terminaison de l'axone. Lorsqu'il arrive à

l'extrémité de l'axone du neurone presynaptique, il provoque l'ouverture des canaux Ca^{2+} et la libération par exocytose des neurotransmetteurs, dont le principal est le glutamate, dans l'espace intersynaptique. Ces derniers s'attachent aux neurorécepteurs de la membrane dendritique du neurone postsynaptique. Cet événement va entraîner l'ouverture de canaux ioniques $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$, la dépolarisation de la membrane postsynaptique, et donc la formation d'un nouveau potentiel d'action. De l'énergie est alors nécessaire pour le rétablissement des concentrations initiales synaptiques en K^{+} et en Ca^{2+} par des pompes ioniques actives, et pour la récupération des neurotransmetteurs.

Détaillons maintenant ces mécanismes de récupération des neurotransmetteurs et de consommation d'énergie associée. La récupération des neurotransmetteurs implique soit le mécanisme de "*re-uptake*", c'est à dire le transport actif de ces molécules dans la terminaison axonique du neurone présynaptique, soit l'action indirecte de cellules gliales, les astrocytes. Une fois entré dans l'astrocyte, le glutamate est transformé en glutamine selon une réaction qui nécessite de l'énergie. De plus, comme le transport du glutamate est lié à celui du Na^{+} , la concentration en Na^{+} dans l'astrocyte augmente, ce qui entraîne une activation des pompes $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ également consommatrices d'énergie. Ces pompes permettent de rétablir l'équilibre électrochimique dans l'espace intersynaptique. Le glutamine produit est relâché hors des astrocytes, puis utilisé par les neurones pour régénérer leur stock de neurotransmetteurs.

La propagation d'un signal nerveux, et plus particulièrement la connexion synaptique, nécessite donc de l'énergie qui est produite sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate), soit par respiration aérobie dans les mitochondries des neurones (réaction 1.1), soit par glycolyse anaérobie dans les astrocytes (réaction 1.2). Ces deux réactions consomment du glucose mais seule la première consomme de l'oxygène. Leur entrée dans les tissus est assurée par les pieds astrocytaires des astrocytes qui sont en contact avec les capillaires sanguins dans lesquels les deux molécules réactives (oxygène et glucose) circulent. L'un des produits de la glycolyse est le lactate qui semble également jouer un rôle dans la transformation du glutamate en glutamine et est ensuite relâché

dans les capillaires sanguins. Le processus aérobique, la respiration, produit de l'eau, du CO_2 , et 28 molécules d'ATP. Elle est donc plus efficace que la réaction anaérobique, la glycolyse, qui ne produit que deux molécules d'ATP pour chaque molécule de glucose consommée. Les réactions de respiration et de glycolyse s'expriment respectivement par (Widmaier et al., 2004) :



et les étapes décrites ci-dessus sont reprises à la figure 1.1.

1.1.1.2 Evolution des concentrations et du débit sanguin

Le glucose et le dioxygène sont transportés dans le sang. L'oxygène est attaché à l'hémoglobine qui constitue son moyen de transport privilégié puisqu'elle permet de transporter 98% de l'oxygène sanguin contre 2% pour la diffusion plasmatique. L'hémoglobine est une molécule complexe. Elle est constituée de quatre sous unités (deux alpha et deux beta) qui permettent chacune de transporter une molécule de dioxygène qui se lie à l'ion Fe^{2+} situé au centre de chacun des quatre groupes "hème" (Figure 1.2). L'association dans des capillaires pulmonaires de la molécule d'hémoglobine avec les molécules de dioxygène forme la molécule d'oxyhémoglobine (HbO). Une fois l'oxygène consommé au niveau des capillaires selon les principes exposés dans le dernier paragraphe, la molécule d'hémoglobine devient la molécule de déoxyhémoglobine (HbR). Or, d'après la réaction (1.1), la consommation locale en oxygène est proportionnelle au besoin local en énergie et donc à l'activité neuronale. Les conséquences d'une activation neuronale seraient donc une augmentation de la concentration en HbR et une diminution de la concentration en HbO si seul le phénomène de consommation entrait en jeu.

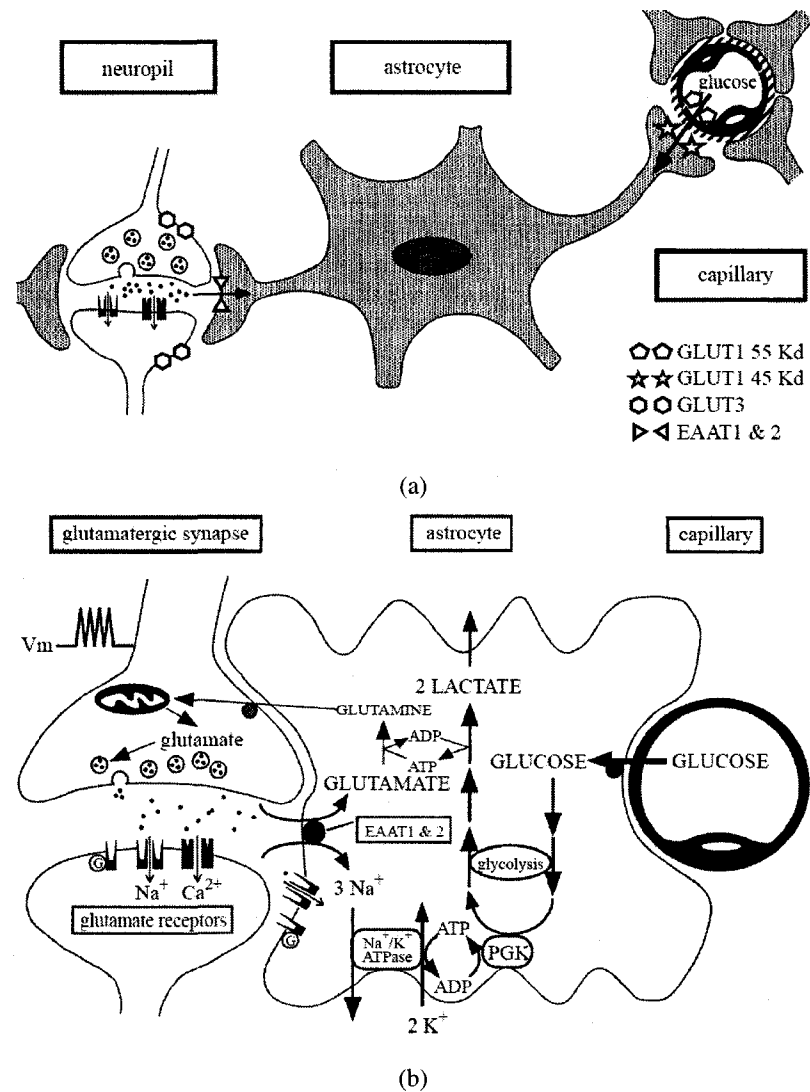


FIG. 1.1 La figure (a) indique les relations entre les neurones, les astrocytes et les capillaires sanguins. La figure (b) résume les étapes conduisant à la consommation de glucose et d'oxygène suite à l'arrivée d'un potentiel d'action à l'extrémité d'un neurone postsynaptique, ainsi que le rôle de l'astrocyte. Ces deux figures sont tirées de Magistretti (1999).

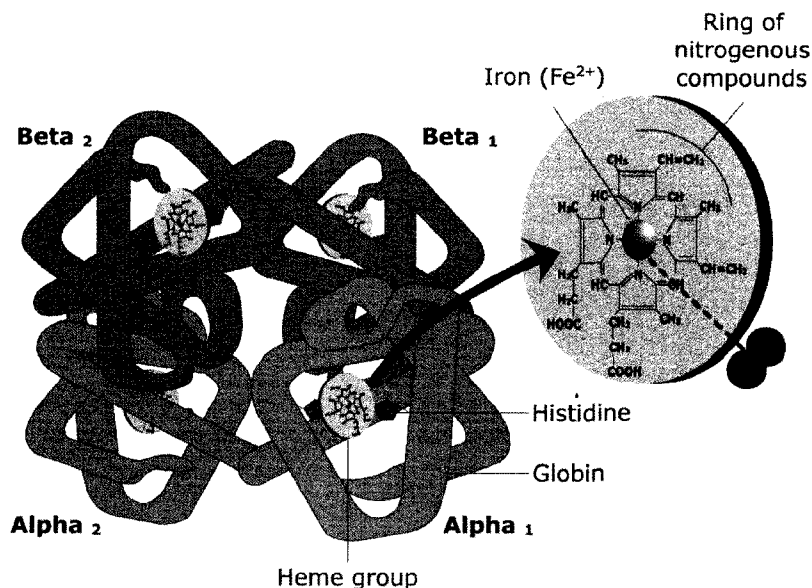


FIG. 1.2 Structure de la molécule d'hémoglobine Sheffield (2008). On distingue les quatre sous-entités (α_1 , α_2 , β_1 et β_2), les quatre groupes "heme", ainsi que l'ion Fe^{2+} où se lie la molécule de dioxygène. Tirée de (Sheffield, 2008).

Il faut néanmoins tenir compte de l'augmentation du flux sanguin régulée par la dilatation des artérioles. En effet, les capillaires sanguins n'étant pas entourés par des muscles lisses afin de faciliter les échanges avec les tissus, seules les artérioles peuvent intervenir en amont sur cette régulation. L'augmentation du flux s'explique par la hausse de la demande en oxygène et en glucose du système nerveux central (SNC) alors que ce dernier ne possède que très peu de réserves propres. Cela entraîne un manque à la fois en glucose et en oxygène que la réponse hémodynamique vise à combler. Plusieurs agents pondèrent la dilatation des artérioles. Girouard and Iadecola (2006) distinguent trois catégories : les ions vasodilatateurs, les facteurs morphologiques et les neurotransmetteurs. Parmi la première catégorie, il indique que l'augmentation de la concentration extracellulaire en ions K^+ , produits lors de la transmission synaptique décrite précédemment, entraîne l'ouverture des canaux K^+ situés sur la membrane des cellules des muscles entourant les artérioles, et la relaxation de ces muscles. Parmi les facteurs morphologiques, il semble que l'augmentation de la concentration en lactate consécutive à la glycolyse induit une

augmentation de la concentration en H^+ , ce qui entraîne une vasodilatation. De plus, le neurotransmetteur adénosine, tout comme le H^+ , s'accumule dans les tissus lors d'une activation et plus particulièrement lorsque la demande en oxygène est supérieure à l'apport vasculaire. D'après Kuschinski (2000), l'adénosine et le H^+ ont un effet seulement si le mécanisme K^+ ne suffit pas à provoquer une dilatation suffisante des artérioles. Girouard and Iadecola (2006); Kuschinski (2000) évoquent également l'influence des interneurons qui entourent les vaisseaux sanguins et relâchent le neurotransmetteur hypéramique norepinephrine.

La dilatation des artérioles entraîne l'augmentation du flux (BF pour sa traduction anglaise Blood Flow, plus courante dans la littérature) et du volume sanguin (BV, pour Blood Volume) et de la concentration en HbO au dépend de celle en HbR. Comme elle l'emporte largement sur la consommation (Malonek and Grinvald, 1996), l'activation est suivie quelques secondes après la stimulation d'une augmentation de la concentration en HbO et d'une chute de celle en HbR. Ces changements hémodynamiques sont locaux et peuvent être utilisés pour caractériser spatialement l'activation neuronale aussi bien en IRM fonctionnelle (Effet BOLD) qu'en imagerie optique intrinsèque (HbO et HbR) ou qu'en imagerie Doppler ou par speckle (flux sanguin). D'après Valabrege (2003), dans le cortex, les variations sont maximales entre cinq et six secondes après la stimulation .

Comme la consommation d'oxygène précède l'afflux sanguin, on devrait également observer une augmentation plus nuancée de la concentration en HbR peu avant le pic de HbO. Cette réponse, appelée *initial dip*, est temporellement plus proche de la stimulation mais est également plus localisée spatialement et peut donc être utilisée pour déterminer les zones d'activation par Malonek and Grinvald (1996); Devor et al. (2003). Cependant, plusieurs points viennent limiter son utilisation : sa faible amplitude nuance son intérêt par rapport à celle du pic de débit selon Sheth et al. (2003, 2004); Dunn et al. (2005), et d'autres études montrent qu'il disparaît lorsque la diffraction des tissus est prise en compte (Valabrege, 2003). De plus, l'*initial dip* peut également résulter de l'augmenta-

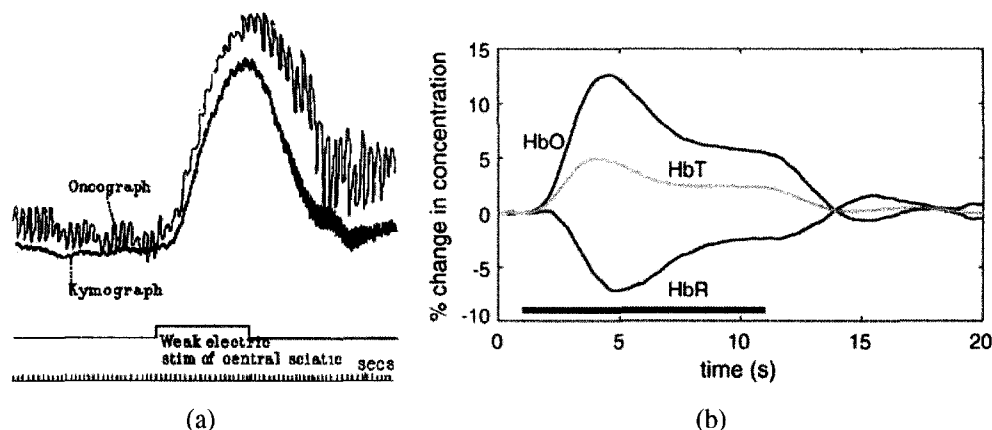


FIG. 1.3 La figure (a) représente la première mise en évidence d'une réponse morphologique par Sherrington dans Roy and Sherrington (1890). L'oncographe y représente une mesure de la variation de la taille du cortex, et le kymographe les variations de la pression systémique. La figure (b) décrit l'évolution typique des concentrations en HbR, HbO et $HbT = HbO + HbR$ lors d'une réponse neuronale Dunn et al. (2005).

tion du volume sanguin et du flot sanguin sans nécessiter une consommation réelle de l'oxygène, comme l'a démontré Hathout et al. (1999) à travers un modèle analytique considérant que le taux de consommation de l'oxygène reste constant. L'existence de l'*initial dip* ainsi que sa signification font toujours l'objet d'un débat, et il paraît pour cela hasardeux de concentrer l'étude de la réponse hémodynamique sur ce seul élément. Villringer (2000) distingue de plus les deux composantes du débit : la vitesse (BF) et le volume (BV). Il montre, en supposant que la consommation d'oxygène reste constante et grâce à la chute de la concentration en HbR, que l'augmentation du débit est liée à l'augmentation de la vitesse plus qu'à celle du volume.

En conclusion, mesurer à la fois les évolutions des concentrations sanguines et de la vitesse permet de déterminer les paramètres de la réponse hémodynamique. Elles permettent en outre d'estimer la consommation métabolique associée à l'activation en calculant le $CMRO_2$ (Cerebral Metabolic Rate for O_2) dont l'importance sera discutée au chapitre 6.

1.1.2 Nature du couplage

La lecture de Sheth et al. (2003, 2004); Hewson-Stoate et al. (2005); Devor et al. (2003) montre que le couplage neurovasculaire n'est pas linéaire : l'amplitude normalisée de la réponse hémodynamique suit une loi exponentielle par rapport à l'activité neuronale mesurée par électrophysiologie. Trois cas possibles pour cette relation ont été étudiés : le cas strictement linéaire ($y = ax$), le cas linéaire avec seuil ($y = ax + b$) et le cas exponentiel ($y = ax^c$). Ce dernier maximise la probabilité de vraisemblance dans le cadre d'un test Chi carré, les paramètres correspondant étant $a = 0.28$ et $c = 1.37$ (Figure 1.4). Cette propriété est importante puisque la non linéarité influence l'interprétation des résultats de la réponse hémodynamique. Par exemple, en faisant l'approximation que la réponse neuronale est linéaire à l'amplitude du pic du BV, on sous estime l'activation provoquée par les amplitudes faibles et sur estime au contraire celle provoquée par les amplitudes fortes.

La réponse hémodynamique croît par rapport à l'intensité de la stimulation jusqu'à atteindre un plateau aussi bien dans le cortex (Devor et al., 2003; Sheth et al., 2004) que dans la moelle épinière (Sasaki et al., 2002, 2003). Aussi, augmenter la durée de stimulation amplifie la réponse d'après Deneux (2006) qui souligne de plus que la relation entre le temps de stimulation et la réponse en volume n'est pas linéaire. Enfin, la fréquence de stimulation influence aussi la réponse qui est maximale pour 10 Hz selon Sheth et al. (2004, 2003).

La réponse hémodynamique est donc définie comme la réaction du système vasculaire de l'organisme pour combler les besoins nécessaires à une activité neuronale. Dans cette section, nous avons détaillé comment la transmission du message nerveux au niveau synaptique induit une consommation d'oxygène et une dilatation des artérioles. Enfin, comme le lien entre la réponse neuronale et hémodynamique n'est pas direct, nous avons montré à partir d'une revue de la littérature les principaux résultats permettant de mieux

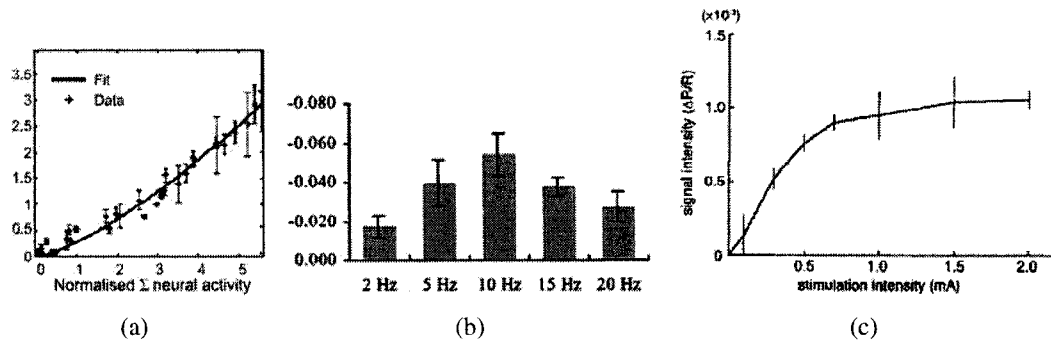


FIG. 1.4 Couplage de l'intensité de la réponse hémodynamique en fonction de l'activité neuronale mesurée par électrophysiologie (a) (Hewson-Stoate et al., 2005), de la fréquence (b) (Sheth et al., 2003), et de l'intensité de la stimulation (c) (Sasaki et al., 2002).

comprendre leur couplage.

1.2 Organisation neuronale de la moelle épinière

Le but de l'étude étant la compréhension de ce phénomène au niveau de la moelle épinière, nous allons maintenant détailler la structure neuronale de cette dernière.

1.2.1 Organisation générale

La moelle épinière appartient avec le cortex au système nerveux central. Son organisation est cependant remarquablement différente. La matière blanche, composée des fuseaux myéliniques des fibres sensibles et motrices est située en périphérie. La matière grise est constituée des interneurones, des cellules gliales, des corps cellulaires et des dendrites des motoneurones, et forme un papillon au centre de la moelle. Le canal de l'épendyme complète cette structure illustrée à la figure 1.5. L'organisation entre matière blanche et matière grise est donc inversée par rapport au cortex. Nix et al. (1976) évalue

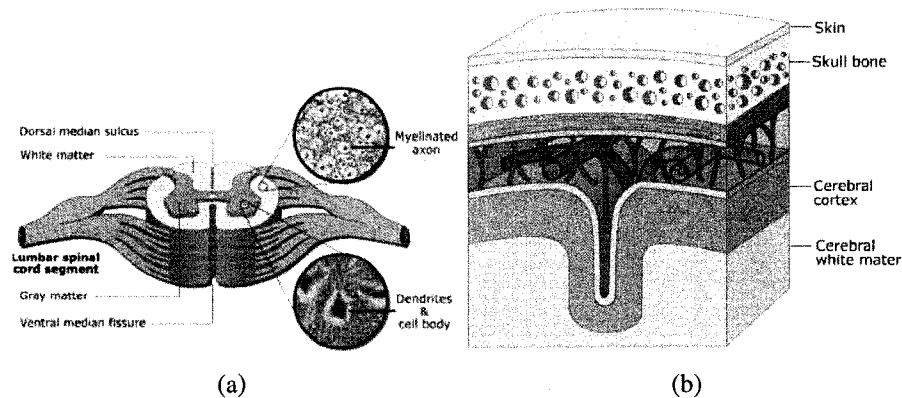


FIG. 1.5 Descriptions anatomiques de la moelle épinière (a) et du cortex (b) permettant de mettre en évidence l'inversion entre la matière blanche et la matière grise. Tirées de (Sheffield, 2008)

l'épaisseur de la matière blanche de la moelle épinière du rat à 200-300 μm , et celle de la matière grise à 1700-2000 μm . La moelle est de plus séparée dans de sens de la longueur en plusieurs segments (31 chez l'humain) regroupés en quatre groupes : segments cervicaux (C), thoraciques (T), lombaires (L) et enfin sacrés (S). Une paire de nerfs spinaux est issue de chacun de ces segments.

1.2.2 Description des voies réflexes

Le nerf sciatique, comme tous les nerfs spinaux, naît dans la moelle épinière. Il est constitué du regroupement de branches terminales, la plus grosse étant le nerf tibial, la plus petite le nerf péronéal, et possède deux racines : une racine dorsale constituée par les axones des neurones sensitifs et une racine ventrale constituée par ceux des neurones moteurs. Dans cette étude, nous excitions les fibres sensitives et motrices puisque leur séparation n'intervient qu'au niveau de la moelle. Nous allons donc détailler la propagation du message nerveux. Le signal se propage vers le système nerveux central le long du neurone sensitif jusqu'à atteindre son corps cellulaire situé dans le ganglion spinal, puis continue sa progression jusqu'à sa terminaison axonique dans la matière grise

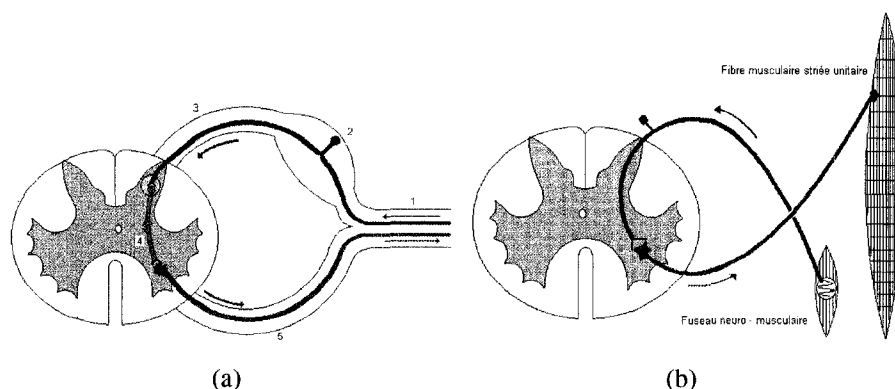


FIG. 1.6 Connexions neuronales intervenant dans les arcs réflexes polysynaptique (a) et motatique (b). Dans (a), 1 est le nerf spinal, 2 le ganglion spinal, 3 la racine dorsale sensitive, 4 un ou plusieurs interneurons et 5 la racine ventrale motrice (Boutillier and Outrequin, 2007).

de la moelle. Le signal se propage également dans le neurone moteur jusqu'à atteindre son corps cellulaire situé dans les cornes antérieures de la substance grise de la moelle. D'autres neurones interviennent à un niveau plus local dans la propagation du signal : les interneurons. Ils établissent la connexion entre les neurones sensitifs et les neurones moteurs et peuvent soit les inhiber soit les exciter. L'arc réflexe est alors qualifié de polysynaptique (Figure 1.6(a)) et peut également entraîner l'excitation du muscle antagoniste, qui se situe du côté opposé à la source du message nerveux, par l'intermédiaire d'un interneuron traversant latéralement la moelle épinière. L'arc réflexe myotatique ne fait intervenir au contraire que le neurone moteur et le neurone sensitif (Figure 1.6(b)) et est donc monosynaptique.

Les voies ascendantes sensitives sont également excitées par la stimulation du nerf sciatique. Elles conduisent le message nerveux jusqu'à la région somatosensitrice du cerveau mais ne sont pas étudiées dans ce travail bien que la même technique d'imagerie permette de préciser leur projection.

1.2.3 Profondeur supposée de l'activation

Comme nous l'avons vu plus haut, la réponse hémodynamique est issue de la propagation inter-synaptique du message nerveux. Or, dans la moelle, plusieurs types de synapses existent : entre un interneurone et un motoneurone, entre un motoneurone et un neurone sensitif, entre un neurone sensitif et un interneurone, ou entre deux interneurones. Déterminer quel type de synapses intervient dans la réponse enregistrée est important puisqu'elles ne se situent pas à la même profondeur dans la moelle. En effet, les motoneurones sont localisés dans la corne ventrale antérieure, à une profondeur supérieure à 1200 μm , tandis que les interneurones sont concentrés dans la corne dorsale à une profondeur de 300-1000 μm . L'origine des profondeurs est prise à la surface dorsale de la moelle.

Willis and Coggeshall (1991) estiment la proportion entre les populations de motoneurones et d'interneurones dans le segment sacral S2. Il conclut que ces derniers représentent 97% du nombre total de neurones dans cette région contre 2% pour les motoneurones et 1% pour les neurones des voies ascendantes. Seuls les interneurones semblent par conséquent pouvoir être imagés optiquement dans la moelle. Sasaki et al. (2002) confirme cette affirmation puisque l'injection d'un bloqueur synaptique Cd^{2+} à la surface dorsale de la moelle entraîne la disparition du signal. Cela corrobore de plus le fait que la consommation d'énergie est associée aux activités synaptiques, comme nous l'avons énoncé au paragraphe 1.1.1.1. Or, toujours d'après Willis and Coggeshall (1991) qui reprennent les résultats de plusieurs études électrophysiologiques, les interneurones sont situés au niveau des cornes dorsales de la moelle. Deux conclusions peuvent par conséquent être tirées de ces études : premièrement le fait que seule l'activation des voies polysynaptiques est visible par imagerie optique et deuxièmement la localisation dorsale des interneurones. *L'imagerie optique de la moelle est donc basée sur l'activité synaptique des interneurones* qui se situent entre 300 et 1000 μm de profondeur par rapport à la surface dorsale.

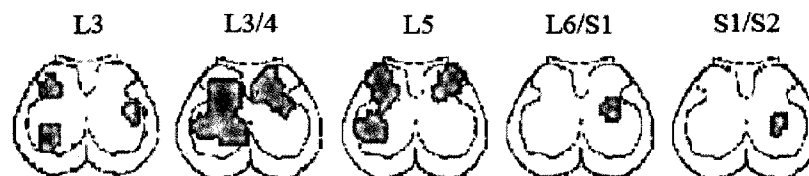


FIG. 1.7 Localisation de l'activation enregistrée par fMRI après stimulation de la patte arrière droite. Tirée de Lawrence et al. (2004).

1.2.4 Localisation attendue de l'activation

Imager la moelle après stimulation permet de déterminer la localisation spatiale des interneurons intervenant dans l'axe réflexe polysynaptique. Les afférences du nerf sciatique ont déjà fait l'objet d'études aussi bien par imagerie IRM (Zhao et al., 2007; Lawrence et al., 2004) que par analyse chimique par injection de horseradish peroxidase HRP couplée à une toxine cholérique (Panneton et al., 2005; Leong and Tan, 1987). Ces études concluent à une localisation dans la région lombaire L3-L6 de la moelle (Figure 1.7). L'activation est principalement ipsilatérale à la stimulation : en stimulant la patte gauche, on devrait observer l'activation au niveau de la partie gauche de la moelle épinière. Lawrence et al. (2004) perçoit cependant également une activation contralatérale. La position de la zone d'activation est relative à celle des racines dorsales du nerf sciatique. Elles correspondent à l'entrée des fibres afférentes dans le système nerveux central et sont clairement visibles une fois la moelle exposée chirurgicalement.

1.2.5 Les différents types de fibres nerveuses

Les nerfs sont constitués d'un ensemble de fibres nerveuses qui possèdent des caractéristiques propres corrélées avec la vitesse de propagation de l'influx nerveux et le seuil d'excitation. En effet, la présence de myéline permet d'assurer l'isolation des axones et donc d'augmenter la vitesse de conduction du signal électrique qui se propage par saut de noeud de Ranvier à noeud de Ranvier alors que le diamètre de la fibre modifie à la fois le

seuil d'excitation et la vitesse de conduction : les plus grosses fibres sont plus facilement excitables et propagent le message plus rapidement (Lloyd, 1962; Kinzelin, 1979).

On classe tout d'abord les fibres nerveuses selon leur fonction en distinguant les fibres afférentes, qui portent l'information des capteurs sensitifs vers le système nerveux central, des fibres efférentes qui assurent la conduction du message du système nerveux central vers les muscles.

Les fibres sensibles se répartissent selon leur origine musculaire ou cutanée. La présence de myéline permet alors de distinguer au sein des fibres afférentes cutanées les fibres de type-C amyéliniques, qui transportent le message nerveux lié à la douleur (noxious), et les fibres de type-A myéliniques qui acheminent un message de nature non douloureuse (non-noxious). Il existe encore au sein des fibres A une autre différenciation reposant sur le diamètre, celui des fibres A-alpha ($A\alpha$) étant plus grand que celui des fibres A-beta ($A\beta$) et des fibres A-delta ($A\delta$). Ces différences de diamètre impliquent une différence de vitesse de conduction qui, dans les fibres $A\alpha$ est comprise entre 80 et 120 m.s^{-1} , dans les fibres $A\beta$ entre 35 et 75 m.s^{-1} et dans les fibres $A\delta$ entre 5 et 35 m.s^{-1} .

Les fibres sensibles musculaires sont regroupées en quatre entités principalement selon leur diamètre. En citant des études sur les nerfs efférents de la patte arrière du chat, Hunt (1954) forme les groupes suivant : Groupe I (de 12 à 20 μm), Groupe II (de 4 à 12 μm), Groupe III (de 1 à 4 μm). Kinzelin (1979) y ajoute le groupe IV qui, contrairement au groupe I, II et III, est constitué de fibres amyéliniques.

Les fibres motrices sont classées en deux groupes : les fibres motrices A-alpha qui innervent les fibres musculaires contractiles extrafusales des muscles squelettiques et qui constituent les 2/3 des fibres motrices, et les fibres motrices A-gamma dynamiques qui interviennent dans le réflexe monosynaptique de tension musculaire.

La classification des fibres est importante pour ce type d'étude neuronale puisque toutes les fibres ne sont pas activées par la même intensité de stimulation. Dans le cortex, Chang and Shyu (2001); Luo et al. (2007) arrivent à stimuler différenciellement les fibres sensibles de la douleur suivant le niveau de stimulation pris par rapport au seuil (Threshold) :

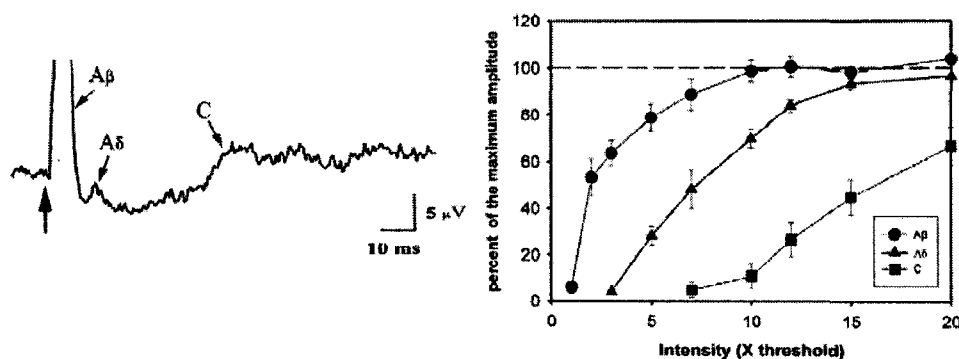


FIG. 1.8 A gauche : enregistrement par électrophysiologie des potentiels d'action dans les racines nerveuses de la région L4-L5 de la moelle épinière après stimulation électrique du nerf sciatique du rat. A droite : variation des amplitudes de ces potentiels selon la force de la stimulation. Tirées de Chang and Shyu (2001).

l'activation des fibres $A\beta$ est visible dès deux Threshold (T), celle des fibres $A\delta$ à 10 T et celle des fibres C à seulement 20 T, mais aussi à visualiser respectivement en IRM et en imagerie optique les zones d'activation correspondantes. Chang and Shyu (2001) souligne de plus le fait que la vitesse de conduction des fibres change selon le type de fibres. Comme le montre la partie gauche de la figure 1.8, les fibres $A\beta$ sont les plus rapides, suivies des fibres $A\delta$, puis des fibres C. Cela concorde avec les chiffres énoncés plus haut et avec le fait que les fibres C sont amyéliniques. Cependant dans la moelle, l'étude récente de Zhao et al. (2007), même si elle parvient à déterminer les projections des fibres C, ne permet pas de détecter l'activation des fibres A.

Conclusion

Cette première partie s'est tout d'abord efforcée de décrire les origines physiologiques de la réponse hémodynamique et d'énoncer à travers une revue de la littérature son couplage avec la réponse neuronale. Cela nous a permis d'établir son origine synaptique. En outre, grâce à l'étude de l'organisation structurale de la moelle, nous avons pu déterminer la profondeur (300-1000 μm) et la position (L3-L6) des interneurons excités par la stimulation du nerf sciatique et mettre en avant le défi que représente l'inversion entre la matière blanche et la matière grise pour l'imagerie intrinsèque de la moelle.

CHAPITRE 2

PRINCIPES PHYSIQUES DE L'IMAGERIE INTRINSÈQUE

2.1 Imagerie optique et mesure de concentrations

La transmission de la lumière à travers un milieu absorbant et diffusant est régie par l'équation de Beer Lambert (Killinger et al., 1995) :

$$I(\lambda, t', x) = I(\lambda, t, 0) e^{-\int_0^x \epsilon(\lambda) N(x', t) dx'} \quad (2.1)$$

Avec $I(\lambda, t', x)$ l'intensité de la lumière fonction de la longueur d'onde, du temps t' et du chemin optique parcouru dans le milieu x , $I(\lambda, t, 0)$ l'intensité incidente, $\epsilon(\lambda)$ le coefficient molaire d'extinction (en mol.L^{-1}), et $N(x, t)$ la distribution spatiale des espèces diffusantes au temps t . En faisant les approximations que premièrement cette distribution est uniforme spatialement, et que ses variations et celles de l'intensité incidente sont négligeables par rapport au temps de propagation de la lumière, et que finalement la distribution est égale à la concentration C des espèces, l'équation (2.1) se simplifie et prend la forme :

$$I(\lambda, x) = I(\lambda, 0) e^{-\epsilon(\lambda) C x} \quad (2.2)$$

On peut alors définir l'absorbance selon :

$$A = -\ln \frac{I(\lambda, x)}{I(\lambda, 0)} = C \epsilon(\lambda) x. \quad (2.3)$$

L'intensité de la lumière décroît donc de manière exponentielle selon le chemin optique parcouru. Cela permet de définir la profondeur de pénétration p_p de la lumière comme la distance dans le tissu sur laquelle l'intensité de la lumière a été réduite de $1/e$ par

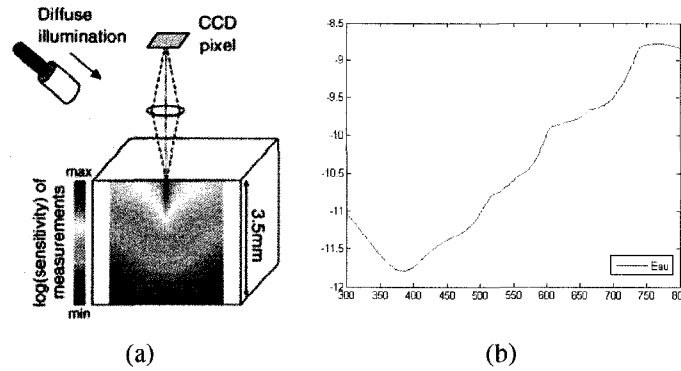


FIG. 2.1 (a) Profil de sensibilité obtenu en imagerie optique (Hillman et al., 2007). (b) Spectre d'absorption de l'eau : évolution du coefficient molaire d'extinction (en mol.L^{-1}) en fonction de la longueur d'onde (en nm). Les coefficients d'absorption (α) sont tirés de H. Buiteveld and J. M. H. Harkvoort and M. Donze, "The optical properties of pure water" in SPIE proceeding on Ocean Optics XII", 1994, puis convertis en coefficients molaires d'extinction. L'axe des ordonnées est en échelle logarithmique.

rapport à l'intensité incidente. Elle est définie à partir du coefficient d'absorption du milieu $\alpha(\lambda) = C\epsilon(\lambda)$. Ainsi,

$$p_p = \frac{1}{\epsilon C} \quad (2.4)$$

Cette notion est importante dans le cas de l'imagerie optique puisqu'il faut s'assurer que la profondeur de pénétration de la lumière est supérieure à la profondeur des tissus étudiés. En considérant des valeurs typiques de $\epsilon = 10^3 \text{ M.mm}^{-1}$ et $C = 10^{-4} \text{ M}$, la profondeur obtenue est de 1 cm, ce qui est largement suffisant pour imager les tissus. L'inhomogénéité du milieu réduit cependant fortement cette distance. La précision latérale de l'imagerie optique n'est pas infinie. Elle est limitée par la diffusion de la lumière dans les tissus. L'équivalence entre la réponse enregistrée en un point et les différences effectives au niveau de ce point est toutefois faite. La figure 2.1.a illustre le profil de sensibilité de l'imagerie optique. L'intensité enregistrée en un point résulte de la superposition de signaux dont l'influence est pondérée par ce profil de sensibilité. Les points de la surface et situés dans l'axe de la caméra influencent le plus le résultat.

Dans notre cas, le milieu absorbant est le système nerveux central, et plus précisément

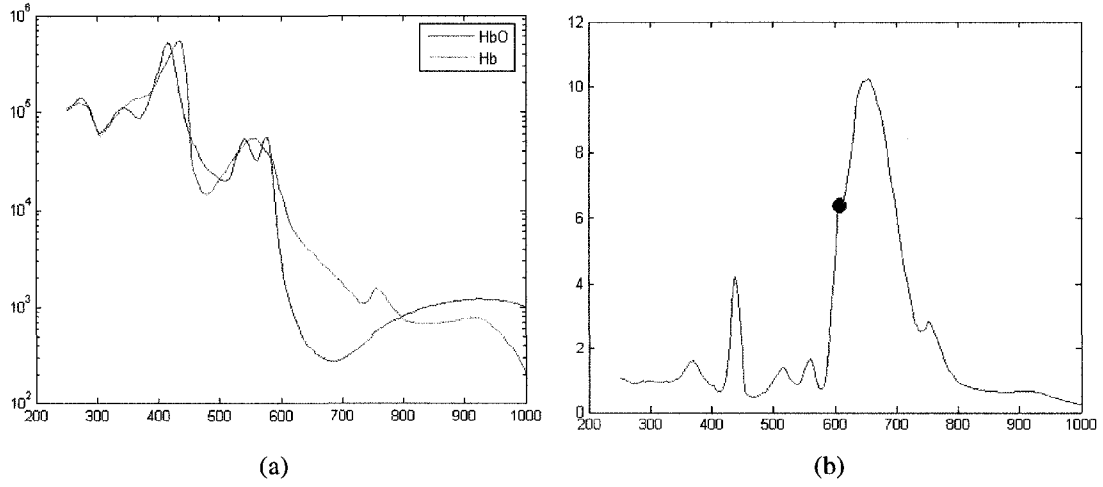


FIG. 2.2 (a) Spectre d'absorption de HbR et HbT : évolution du coefficient molaire d'extinction ϵ (en mol.L^{-1}) des deux molécules en fonction de la longueur d'onde (en nm). (b) Rapport entre ϵ_{HbR} et ϵ_{HbO} . Les données sont tirées du travail de Scott Prahl exposé sur le site du Oregon Medical Laser Center, <http://omlc.orgi.edu/>.

la moelle épinière, qui ne comprend bien sûr pas qu'un seul chromophore : aux longueurs d'onde considérées, les principales molécules absorbantes sont l'oxyhémoglobine (HbO), la déoxyhémoglobine (HbR), les lipides et l'eau. Le spectre d'absorption de l'eau (Figure 2.1.b) montre que son absorption est de l'ordre de $10^{-10} \text{ cm}^{-1}/M$ et est donc négligeable dans la gamme de fréquences utilisées malgré sa forte concentration. L'absorption due aux lipides est du même ordre de grandeur. La bande spectrale de 500-800 nm utilisée en imagerie optique reflexive permet par conséquent de mesurer les variations de concentration en HbO et HbR, dont l'ordre de grandeurs des coefficients d'extinction est de 10^2 , tout en négligeant celles des autres constituants. Selon la propriété d'additivité de l'absorption, nous pouvons écrire la nouvelle loi de Beer Lambert appliquée à ces deux chromophores. Dans la suite, nous notons $I_R = I(\lambda, x)$ et $I_0 = I(\lambda, 0)$.

$$A = -\ln \frac{I_R}{I_0} = [C_{HbO}\epsilon_{HbO} + C_{HbR}\epsilon_{HbR}] x \quad (2.5)$$

En dérivant cette expression, entre deux instants temporels t et $t + \delta t$, il vient :

$$\Delta A = -\ln \frac{I_R(t + \delta t)}{I_R(t)} = [\Delta C_{HbO} \epsilon_{HbO} + \Delta C_{HbR} \epsilon_{HbR}] x \quad (2.6)$$

Avec ΔA le changement d'absorption, ΔC_{HbO} le changement de concentration en HbO et ΔC_{HbR} le changement de concentration en HbR. Dériver cette équation permet de supprimer le terme I_0 d'intensité incidente que nous ne pouvons pas déterminer. L'une des faiblesses de l'imagerie optique repose sur ce calcul puisque (2.6) implique que seules les concentrations relatives entre t et $t + \delta t$ en HbO et HbR peuvent être calculées sans à priori. De plus, ce modèle ignore l'hétérogénéité du milieu et ne tient donc pas compte de la structure du tissu imagé.

L'une des conditions d'application de la loi de Beer Lambert est que la faible concentration des chromophores en présence implique le caractère non diffusant du milieu. Cette propriété n'est pas respectée par les milieux biologiques. La diffusion dans le milieu augmente significativement le chemin optique dépendamment de la longueur d'onde, du coefficient de diffusion et du coefficient d'absorption (Villringer, 2000). Cette dépendance doit être prise en compte pour la résolution de l'équation (2.6) par l'introduction de $x_A(\lambda)$ qui représente la distance moyenne parcourue par les photons dans le milieu. Les améliorations apportées par cette considération peuvent être significatives en imagerie optique intrinsèque d'après Kohl et al. (2000). La loi de Beer Lambert modifiée s'écrit alors :

$$\Delta A = [\Delta C_{HbO} \epsilon_{HbO} x_a(HbO)(\lambda) + \Delta C_{HbR} \epsilon_{HbR} x_a(HbR)(\lambda)] \quad (2.7)$$

x_a dépend de la longueur d'onde, mais aussi des propriétés de diffusion et d'absorption des tissus traversés.

Lorsqu'une seule longueur d'onde est utilisée, nous ne disposons que d'une seule mesure de l'atténuation et il n'est donc pas possible de déterminer les deux concentrations

intervenant dans l'équation (2.6). Cependant, un choix judicieux de la longueur d'onde en fonction des spectres d'absorption de HbR et HbO (Figure 2.2) permet de faire ressortir les caractéristiques de la réponse hémodynamique (Frostig et al., 1990).

Il est en effet possible de choisir une longueur d'onde telle que le coefficient molaire d'extinction de l'une des espèces soit nettement supérieur à celui de l'autre. : $\epsilon_1(\lambda) \gg \epsilon_2(\lambda)$. En choisissant une longueur d'onde de 637 nm, le coefficient molaire d'extinction de HbO est 478.8 cm^{-1} et celui de HbR 4602.4 cm^{-1} . Les variations de concentration en déoxyhémoglobine influencent donc neuf fois plus les fluctuations temporelles du signal que celles en oxyhémoglobine et, sous la condition que ΔHbR et ΔHbO sont du même ordre de grandeur, on peut faire l'approximation :

$$\Delta A(\lambda, t) = \epsilon_{\text{HbR}}(\lambda) \Delta C_{\text{HbR}}(t) x_a(\lambda) \quad (2.8)$$

Si au contraire la longueur d'onde choisie est isosbestique, c'est à dire qu'à cette longueur d'onde les deux coefficients d'extinction sont égaux, l'atténuation permet de déterminer directement les variations de la concentration en hémoglobine totale définie par : $\text{HbT} = \text{HbO} + \text{HbR}$. Cela est notamment le cas pour $\lambda = 570\text{nm}$.

$$\Delta A(\lambda, t) = \epsilon(\lambda) \Delta C_{\text{HbT}} x_a(\lambda) \quad (2.9)$$

Lorsque plusieurs longueurs d'onde sont utilisées, le système d'équations engendrées par chacune des longueurs d'onde peut être résolu complètement et les deux concentrations déterminées.

2.2 Imagerie par speckle et mesure de la vitesse

Nous avons vu que la mesure de la vitesse est importante pour quantifier la réponse hémodynamique. Le flux peut être mesuré par imagerie Doppler mais cette mesure est locale, ce qui impose un balayage de la zone à étudier pour construire des cartes spatiales de vitesse. De telles cartes peuvent être directement déterminées avec l'imagerie par speckle dont les principes seront décrits dans cette partie. Nous allons dans un premier lieu exposer les origines physiques du speckle, puis expliciter le calcul de la vitesse à partir de ses caractéristiques statistiques.

2.2.1 Origines physiques d'un champ de speckle

Le speckle est un champ d'interférences qui sont dues à la cohérence de l'éclairage utilisé (Laser). Nous faisons ici l'hypothèse d'un champ de speckle lointain, puisque la surface est observée à relativement grande distance. Nous utilisons une caméra CCD pour imager ce champ. L'image ainsi formée résulte de la superposition en amplitude de toutes les ondes lumineuses diffusées par l'objet. Or, le fait que le milieu soit diffusif génère des différences de l'ordre d'une ou de plusieurs fois la longueur d'onde ($\lambda = 780$ nm dans notre montage) entre les chemins optiques parcourus par les ondes lumineuses. Ces dernières peuvent en conséquence interférer.

Considérons le cas simple de deux ondes lumineuses émanant de deux points distincts de l'objet et arrivant au même capteur de la caméra CCD. Les deux ondes se distinguent par des phases (ϕ_1 et ϕ_2) et des amplitudes propres (A_{i1} et A_{i2}) mais possèdent la même fréquence f . Elles s'écrivent : $A_1(t) = A_{i1}\cos(2\pi ft - \phi_1)$ et $A_2(t) = A_{i2}\cos(2\pi ft - \phi_2)$. Le point résultant de l'image a une amplitude A_0 et une phase ϕ telles que $A_S(t) = A_0\cos(2\pi ft - \phi)$ avec $A_S(t) = A_1(t) + A_2(t)$. Le capteur mesure A_0 :

$$\begin{aligned}
A_S(t) &= A_1(t) + A_2(t) \\
&= A_{i1}\cos(2\pi ft - \phi_1) + A_{i2}\cos(2\pi ft - \phi_2) \\
&= A_{i1}\cos(2\pi ft)\cos(\phi_1) + A_{i1}\sin(2\pi ft)\sin(\phi_1) + A_{i2}\cos(2\pi ft)\cos(\phi_2) \dots \\
&\quad + A_{i2}\sin(2\pi ft)\sin(\phi_2) \\
&= \cos(2\pi ft) [A_{i1}\cos(\phi_1) + A_{i2}\cos(\phi_2)] + \sin(2\pi ft) [A_{i1}\sin(\phi_1) + A_{i2}\sin(\phi_2)]
\end{aligned}$$

Or, on obtient en développant $A_S(t) = A_0\cos(2\pi ft - \phi)$:

$$A_S(t) = A_0\cos(2\pi ft)\cos(\phi) + A_0\sin(2\pi ft)\sin(\phi)$$

Comme les fonctions sinus et cosinus forment une base de $\mathbb{R}^2$, on peut identifier les termes respectifs en $\cos(2\pi ft)$ et $\sin(2\pi ft)$:

$$\begin{aligned}
A_0\cos(\phi) &= A_{i1}\cos(\phi_1) + A_{i2}\cos(\phi_2) \\
A_0\sin(\phi) &= A_{i1}\sin(\phi_1) + A_{i2}\sin(\phi_2)
\end{aligned}$$

On obtient alors l'intensité de l'onde A_S :

$$\begin{aligned}
A_0^2(t) &= (A_0\sin(\phi))^2 + (A_0\cos(\phi))^2 \\
&= (A_{i1}\cos(\phi_1) + A_{i2}\cos(\phi_2))^2 + (A_{i1}\sin(\phi_1) + A_{i2}\sin(\phi_2))^2 \\
&= A_{i1}^2 [\cos(\phi_1)^2 + \sin(\phi_1)^2] + A_{i2}^2 [\cos(\phi_2)^2 + \sin(\phi_2)^2] \dots \\
&\quad + 2A_{i1}A_{i2} [\cos\phi_1\cos\phi_2 + \sin\phi_1\sin\phi_2] \\
A_0^2(t) &= A_{i1}^2 + A_{i2}^2 + 2A_{i1}A_{i2}\cos(\phi_1 - \phi_2)
\end{aligned}$$

L'interférence est dite constructive lorsque $A_0^2(t)$ est maximale, soit pour des ondes en phase ($\phi_1 - \phi_2 = 0$ modulo π), et destructive lorsque $A_0^2(t)$ est nulle, soit pour des

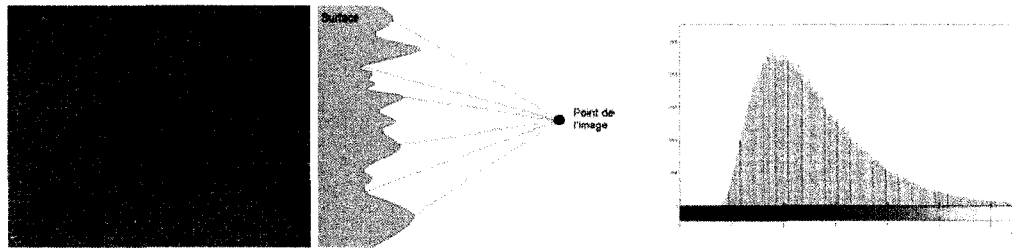


FIG. 2.3 (a) Champ de speckle. (b) Principe des interférences créées par les ondes réfléchies sur une surface granulée (Goodman (1984)). (c) Histogramme du champ de speckle.

ondes en opposition de phase ($\phi_1 - \phi_2 = \frac{\pi}{2}$ modulo π). La différence de phase est directement reliée à la différence de chemin optique. Les différences aléatoires entre les chemins optiques induisent l'existence sur l'image d'un ensemble de points ayant soit une intensité forte soit une intensité nulle. Cette structure, qualifiée de "fourmillement" dans Françon (1978), constitue le speckle. Un exemple de ce phénomène est donné à la figure 2.3.

2.2.2 Calcul de la vitesse des particules

2.2.2.1 Relation entre la vitesse et le contraste

La présence de particules en mouvement dans le milieu modifie ses propriétés diffusives et donc le champ de speckle. Plus la vitesse des particules est grande en un point, plus la variation d'intensité en ce point est rapide. Ces variations étant aléatoires et la caméra intégrant l'intensité reçue sur son temps d'exposition, le contraste du champ de speckle d'une zone en mouvement diminue et la zone concernée est floutée. Les zones de haut contraste correspondent donc aux zones de faible vitesse, les zones de faible contraste à celles de vitesse élevée.

Les développements mathématiques à la base de ce raisonnement ont été exposés pour la première fois dans Fercher and Briers (1981). Ils se basent sur le travail de Good-

man (1984) sur les propriétés statistiques du speckle. Ce dernier démontre le résultat de l'équation (2.10) qui lie la covariance spatiale σ_S^2 d'un champ de speckle avec l'auto-corrélation de ses fluctuations temporelles $C_t(\tau)$ et le temps d'exposition de la caméra T.

$$\sigma_S^2(T) = \frac{1}{T} \int_0^T C_t(\tau) d\tau \quad (2.10)$$

Avec $C_t(\tau) = \frac{I(t) - \langle I \rangle_t}{\langle I(t+\tau) - \langle I \rangle_t \rangle_t}$.

Or, la fonction d'autocorrélation peut s'approcher par une exponentielle négative, fonction caractéristique de la loi de Cauchy-Lorentz, dépendante du temps de corrélation τ_c et de la moyenne temporelle de l'intensité $\langle I \rangle_t$:

$$C_t(\tau) = \langle I \rangle_t^2 \exp(-2\tau/\tau_c) \quad (2.11)$$

Finalement, τ_c est inversement proportionnel à la vitesse moyenne des particules ν :

$$\tau_c = \frac{1}{ak_0\nu} \quad (2.12)$$

Avec k_0 le nombre d'onde du laser utilisé ($k_0 = 1/\lambda$) et a une constante dépendant des propriétés physiques du tissu. Ainsi, plus la vitesse est élevée, plus τ_c est petit. Une approximation de ak_0 est fournie dans Richards and Briers (1997) à partir des travaux décrits dans Bonner and Nossal (1981). L'expression (2.12) devient : $\nu = 3.5/\tau_c \mu m.s^{-1}$. En reportant (2.11) dans (2.10), on obtient :

$$\sigma_S^2(T) = \langle I \rangle_t^2 \frac{\tau_c}{2T} [1 - \exp(-2T/\tau_c)] \quad (2.13)$$

En supposant en outre que l'on peut remplacer la moyenne temporelle de I, $\langle I \rangle_t$, par sa moyenne spatiale $\langle I \rangle$, l'expression finale du contraste $K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle}$ en fonction du temps de corrélation τ_c est donnée :

$$K(T, \tau_c) = \sqrt{\left(\frac{\tau_c}{2T}\right) [1 - \exp(-2T/\tau_c)]} \quad (2.14)$$

En traçant l'évolution du contraste en fonction de τ_c sur la figure 2.4, on retrouve bien que ce que nous avons énoncé plus haut quantitativement, c'est à dire qu'un contraste fort correspond à un temps de corrélation élevé et donc à une vitesse faible. Le contraste est en outre compris entre 0 et 1. Nous notons cependant que la vitesse moyenne des particules ne s'exprime pas simplement en fonction de K et qu'elle doit être déterminée grâce à la courbe, tracée pour un temps d'exposition donné de la caméra. Cette détermination passe par l'inversion de la courbe de relation entre le contraste et le temps de corrélation du speckle (Ayata et al., 2004). Sous Matlab, nous échantillonnons cette relation sur 100 points, puis estimons la valeur de τ_c en déterminant par minimisation de l'erreur quadratique, celle dont le contraste calculé par (2.14) se rapproche le plus du contraste enregistré. Cependant, en appliquant un échantillonnage linéaire sur l'axe des temps de corrélation, la résolution du système est très faible pour les petites valeurs de contraste : en prenant l'exemple de la figure 2.4.a, le même nombre de points servent ainsi à échantillonner les valeurs du contraste entre 0 et 0.5 qu'entre 0.92 et 0.95. Il faut donc opter pour un échantillonnage non linéaire. Nous avons choisi $y = \ln(x)$ avec x un vecteur issu d'un échantillonnage linéaire. La figure 2.4.b montre qu'un tel choix permet de linéariser la courbe de dépendance et d'obtenir un meilleur échantillonnage, notamment pour les contrastes situés entre 0 et 0.5.

2.2.2.2 Calcul du contraste

Deux types de contrastes sont utilisés dans la littérature :

- *Le contraste spatial* (SDC) qui est utilisé le plus fréquemment (Durduran et al., 2004; Dunn et al., 2001; Li et al., 2006) et qui repose directement sur les résultats théoriques présentés ci-dessus. L'image est décomposée en blocs de $N \times N$ pixels ($N = 5$ ou 7), un pixel appartenant à un seul bloc à la fois. Le contraste spatial pour un bloc centré sur le

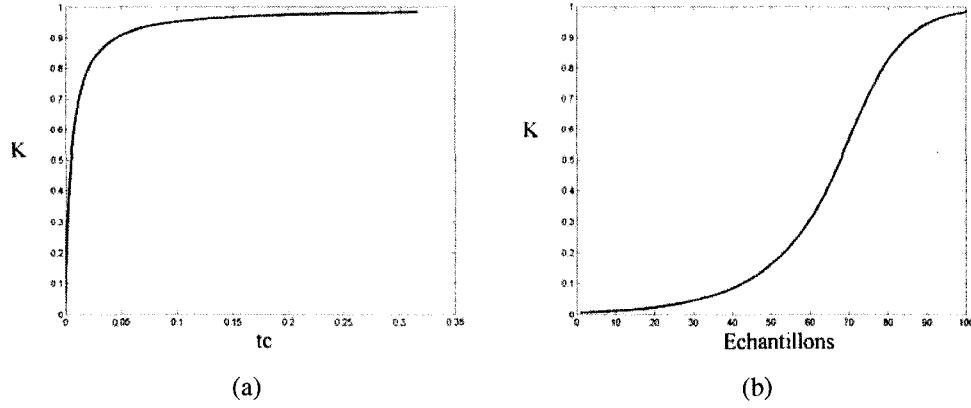


FIG. 2.4 (a) Evolution du contraste K en fonction du temps de corrélation t_c pour $T = 10$ ms et τ_c variant entre 0 et 0.35. (b) Effet sur la courbe d'un échantillonnage non linéaire de l'axe des abscisses.

point de coordonnées (i, j) est calculé par :

$$K_S(i, j) = \frac{\sigma_S(i, j)}{\langle I(i, j) \rangle_S} \quad (2.15)$$

Avec

$$\sigma_S(i, j) = \sqrt{\frac{1}{N^2} \sum_{k=-N/2}^{N/2} \sum_{l=-N/2}^{N/2} (I(i+k, j+l) - \langle I \rangle_S)^2} \quad (2.16)$$

$$\langle I(i, j) \rangle_S = \frac{1}{N^2} \sum_{k=-N/2}^{N/2} \sum_{l=-N/2}^{N/2} I(i+k, j+l). \quad (2.17)$$

Ainsi, vu que N^2 points permettent de calculer une seule valeur de contraste, la résolution spatiale de l'image est divisée par N^2 . Il est également possible d'améliorer la qualité des images en prenant la moyenne temporelle des images de contraste obtenues.

- *Le contraste temporel* (TDC) est introduit dans Cheng et al. (2003) et utilisé dans Tan et al. (2004) et Li et al. (2005). Son utilisation repose sur l'équivalence entre le moyennage spatial de l'intensité instantanée du speckle sur une surface à un temps donné avec

le moyennage temporel des fluctuations du speckle à un point donné. Une explication plus précise est fournie par Briers (2001) qui affirme que "le spectre des fluctuations doit dépendre de la vitesse des mouvements" et que par conséquent, les propriétés statistiques des fluctuations temporelles du speckle permettent de déterminer la vitesse des particules en mouvement. Il ajoute que l'équivalence entre les statistiques temporelles et spatiales du speckle repose sur le caractère gaussien de la distribution de la vitesse des diffusants et de celle d'un champ de speckle idéal. Cependant, l'histogramme présenté à la figure 2.3 montre que la distribution d'un champ de speckle réel n'est pas parfaitement gaussienne. Etant données N images de speckle, la carte de contraste temporel K_T est construite selon :

$$V(i, j), K_T(i, j) = \frac{\sigma_T(i, j)}{\langle I(i, j) \rangle_T} \quad (2.18)$$

Avec

$$\sigma_T(i, j) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{t=1}^N (I_t(i, j) - \langle I \rangle_T)^2} \quad (2.19)$$

$$\langle I(i, j) \rangle_T = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N I_k(i, j). \quad (2.20)$$

Une comparaison de ces trois méthodes (SDC, SDC avec moyennage et TDC) est présentée par Tan et al. (2004). Le contraste temporel semble être le plus efficace puisqu'il converge plus rapidement selon le nombre de points considérés pour le calcul d'une valeur du contraste, c'est à dire selon la taille de la fenêtre spatiale considérée pour la SDC et le nombre d'images pour la TDC, mais aussi qu'il minimise le temps de calcul par rapport à la SDC avec moyennage. La figure 2.5 montre combien la précision obtenue par TDC est supérieure à celle obtenue par SDC. Cependant, construire des cartes de contraste en utilisant la méthode temporelle nécessite une fréquence d'acquisition des images élevée afin de conserver une fréquence réelle suffisante. Des considérations pratiques nous empêchent donc d'utiliser cette méthode pour évaluer la réponse hémodynamique et nous conduisent à lui préférer la méthode spatiale.

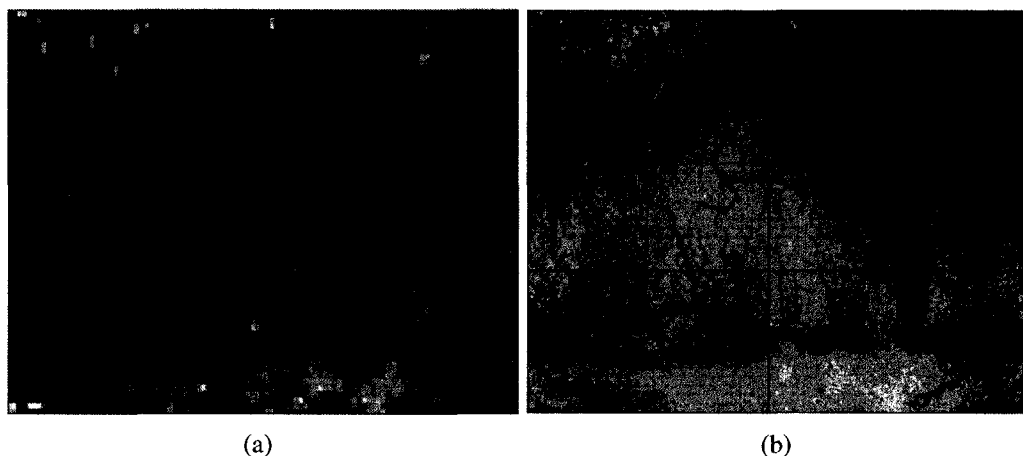


FIG. 2.5 Images de contraste obtenues selon la méthode spatiale (a) et temporelle (b) sur un cortex de chat. Données acquises dans le laboratoire de C. Casanova avec la collaboration de Matthieu Vani.

2.2.3 Influence des paramètres d'acquisition

2.2.3.1 Taille du speckle et résolution optique

Importance : La résolution optique est un paramètre essentiel pour assurer un échantillonnage correct du champ de speckle d'après Briers (2001). En effet, pour minimiser l'erreur sur le contraste, un speckle doit être représenté au minimum par un pixel. Dans le cas contraire, un pixel enregistrera une intensité moyenne et par conséquent l'amplitude des fluctuations et le contraste seront réduits. Cette observation a été notamment confirmée expérimentalement par Yuan et al. (2005). Briers (2007) ajoute que si la taille du speckle est largement supérieure à celle d'un pixel, le contraste spatial est calculé sur une fenêtre dont les pixels sont issus du même speckle. L'équation liant le contraste avec la vitesse n'est plus valable dans ce cas. Il faut donc s'assurer que la taille du speckle s'approche le plus possible de la taille d'un pixel.

La taille du speckle ne dépend pas de la surface éclairée mais des paramètres du système optique et plus précisément de l'ouverture de lentille utilisée. La lumière est diffractée lorsqu'elle passe dans l'ouverture circulaire de l'objectif et un point est donc représenté

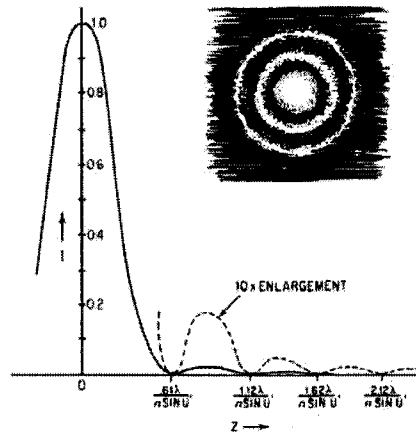


FIG. 2.6 Intensité lumineuse I d'une tache de Airy en fonction de la distance au centre Z . La sous-figure en haut à droite représente son apparence. Figures tirées de Smith (2000).

par une tache de Airy selon Smith (2000). Elle est illustrée à la figure 2.6. La résolution est fixée par le critère de séparation de Rayleigh qui établit que deux points sont distincts si le maximum de l'un correspond à la première extinction de l'autre. Or, la distance entre le centre du disque et la première extinction est de $1.22 \lambda(f/\#)$, avec $f/\#$ le nombre d'ouverture de la caméra qui est défini comme le rapport entre la longueur focale de la lentille avec l'ouverture de l'objectif. Pour qu'un speckle soit représenté par au moins un pixel, il faut donc que sa taille Z_s satisfasse la condition suivante :

$$Z_s > 1.22\lambda(f/\#) \quad (2.21)$$

Cette équation servira dans la suite à calculer l'ouverture de caméra à utiliser en fonction des paramètres du système optique utilisé.

2.2.3.2 Influence du temps d'exposition de la caméra

D'après l'équation (2.14), le contraste dépend du temps d'exposition T de la caméra. Yuan et al. (2005) comparent expérimentalement l'évolution du maximum des variations

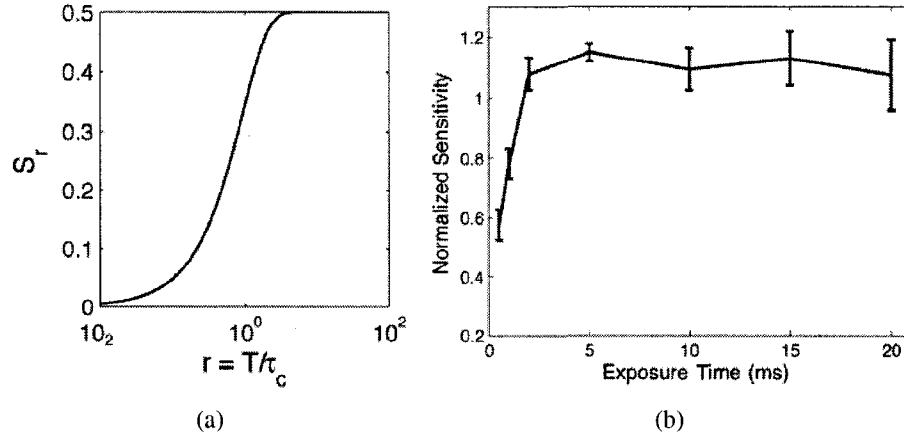


FIG. 2.7 Influence du temps d'exposition sur l'amplitude du pic de sensibilité en théorie (a), et en pratique (b). Pour $T \leq 2$ ms, la sensibilité baisse énormément alors qu'elle est quasiment constante pour $T \geq 5$ ms. Les figures sont tirées de Yuan et al. (2005).

de contraste observées en fonction du temps d'exposition, et aboutissent à la détermination de la valeur optimale (10 ms) qui doit à la fois maximiser l'amplitude du pic et minimiser le bruit relatif. Ils constatent en effet que ce dernier augmente avec le temps d'exposition. La forme de la courbe des amplitudes obtenues concorde de plus avec le calcul théorique de la sensibilité relative S_r qui représente l'augmentation en contraste considérant une variation en vitesse donnée. S_r est alors obtenue par :

$$S_r = \left| \frac{\partial K/K}{\partial v/v} \right| = - \frac{r}{K} \frac{dK}{dr} \quad (2.22)$$

Avec $r = T/\tau_c$. Les courbes théoriques et expérimentales tirées de Yuan et al. (2005) sont représentées à la figure 2.7. L'étude de cet article nous a permis de choisir la bonne valeur pour le temps d'exposition de la caméra : 10 ms.

Nous disposons donc d'un outil permettant d'évaluer la répartition des vitesses dans les tissus et de détecter d'éventuelles variations consécutives à une activation. Déterminer les cartes de flux permet en outre de segmenter les vaisseaux sanguins. La vitesse sanguine y est en effet la plus importante et un seuillage des cartes de vitesse permet de

séparer les vaisseaux des tissus environnants.

Nous avons vu dans la première partie que la réponse hémodynamique se caractérise localement par une modification des concentrations sanguines et par une augmentation de la vitesse. Les principes physiques des deux méthodes d'imagerie intrinsèque présentées dans cette partie permettent d'évaluer ces deux caractéristiques. La prochaine partie décrira l'instrumentation mise en place pour pouvoir générer et enregistrer les signaux d'imagerie optique et d'imagerie laser, dont les principes ont été énoncés dans ce chapitre.

CHAPITRE 3

INSTRUMENTATION ET PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Les techniques d'imagerie intrinsèque ont été appliquées à l'activation neuronale de la moelle épinière de rat. Cette partie vise à présenter tout d'abord le protocole chirurgical, puis l'instrumentation et enfin la manipulation du système d'imagerie.

3.1 Protocole chirurgical

L'animal est anesthésié à l'isoflurane à 5% de concentration à l'aide d'un masque. La chirurgie se décompose ensuite en plusieurs étapes de complexité inégale : la trachéotomie, la mise à nue du nerf sciatique et l'exposition de la moelle épinière.

La trachéotomie permet de ventiler artificiellement l'animal par une pompe dont on peut régler la pression intra pulmonaire maximale, et la fréquence de respiration en battements par minute. Le rythme respiratoire permet en outre de régler la quantité de CO_2 expiré. Comme nous mesurons la concentration sanguine en CO_2 , ce paramètre a une influence certaine sur la réponse hémodynamique et il est très important de la mesurer précisément. Elle influe en effet sur la forme de la réponse hémodynamique : Kemna and Posse (2001) montrent dans le cadre d'une étude humaine sur le cortex visuel primaire qu'une augmentation de la concentration en CO_2 entraîne à la fois un retardement du pic maximal et une dispersion de la réponse. Même si ce n'était pas la cas pour les premières expériences, cette mesure est maintenant assurée par un analyseur de gaz. La trachéotomie consiste à pratiquer une incision au niveau de la trachée haute, puis d'insérer la partie inférieure d'un tube en Y dans l'ouverture pratiquée. Les deux autres extrémités sont reliées au respirateur.

Le nerf sciatique est exposé par l'incision de la patte arrière gauche. Une électrode de stimulation est alors positionnée directement sur le nerf. Si la partie gauche de la moelle a été endommagée lors de la chirurgie (Rat 24), la stimulation est pratiquée sur le côté droit.

Une incision dorsale permet d'exposer la colonne vertébrale. Les processus épineux sont ensuite enlevés, sauf au niveau sacral où ils servent à attacher l'une des clampes de fixation, ainsi que les vertèbres qui protègent habituellement la moelle épinière. Cette dernière est alors exposée et n'est plus protégée que par les méninges constitués par la dure mère (dura mater), l'arachnoïde, et la pie mère (pia mater). Jusqu'à ce que des considérations chirurgicales nous poussent à la laisser intacte, la dure mère a été généralement enlevée systématiquement pour les vingt premières expériences.

Le nettoyage consécutif au saignement des os latéraux peut parfois conduire dans ce cas à des dommages irréversibles sur la moelle et plus précisément sur le vaisseau sanguin central, notamment lorsque la pression sanguine est élevée. Plusieurs solutions ont été apportées pour réduire les saignements : tout d'abord la cicatrisation des vaisseaux sanguins environnants à l'aide d'un outil chauffant, puis grâce à du chlorure d'argent. Cependant, la première option entraîne la création supposée de caillots sanguins et peut donc conduire à la perte prématurée de l'animal. La seconde, testée sur un seul rat, est nettement moins contrôlable et peut entraîner une opacification de la dure mère en cas de contact du produit avec cette dernière. La nécessité de contrôler parfaitement le protocole chirurgical avant d'entamer les expériences sur les rats lésés nous a amenés à trouver d'autres solutions. Nous avons finalement choisi d'utiliser du Gelfoam (Pharmacia&Upjohn) qui assure une cicatrisation idéale sans utilisation de produits chimiques.

La deuxième clampe de fixation enserre les vertèbres au niveau L1. L'absence de mouvement de la moelle est alors vérifiée au microscope. Un bain d'huile formé grâce à la peau de l'animal permet d'uniformiser la surface à imager et aussi d'éviter le dessèchement des tissus exposés.

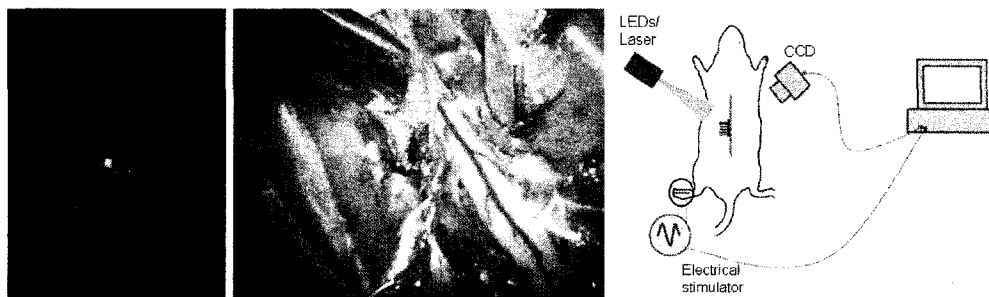


FIG. 3.1 (a) Photographie du montage sur laquelle on peut apercevoir la diode d'illumination, la caméra CCD, la lentille macroscopique, et le stimulateur électrique situé sur la patte gauche de l'animal. (b) Photographie de la vue dans le microscope de la préparation chirurgicale de la moelle. On distingue deux des clampes de fixation. (c) Schéma simplifié du montage utilisé.

Une fois la chirurgie terminée, l'isoflurane est remplacé dépendamment de l'expérience, soit par un mélange de kétamine (50mg/kg) - xylazine (6.5mg/kg), soit par de l'alphachloralose (60 mg/kg en bolus, puis 30 mg/kg/h). Il est également paralysé avec 4 mg/kg/h de pancuronium.

3.2 Instrumentation

L'instrumentation nécessaire à ce type d'imagerie est relativement simple en comparaison avec d'autres modalités d'imagerie fonctionnelle telles que l'IRM ou le PET. Le système doit permettre d'imager des petites zones avec à la fois une précision, une sensibilité et une rapidité suffisantes. A l'origine du projet, le montage était inexistant et le choix des composants était fixé en fonction des expériences anticipées. Voici comment les choix furent établis :

Caméra : Les caractéristiques de la caméra choisie (Toshiba Teli CS3960DCL) répondent aux objectifs fixés : la réponse spectrale permet de capter la lumière aussi bien dans le visible que dans l'infra-rouge (Figure 3.2), la fréquence d'acquisition maximale est de 30

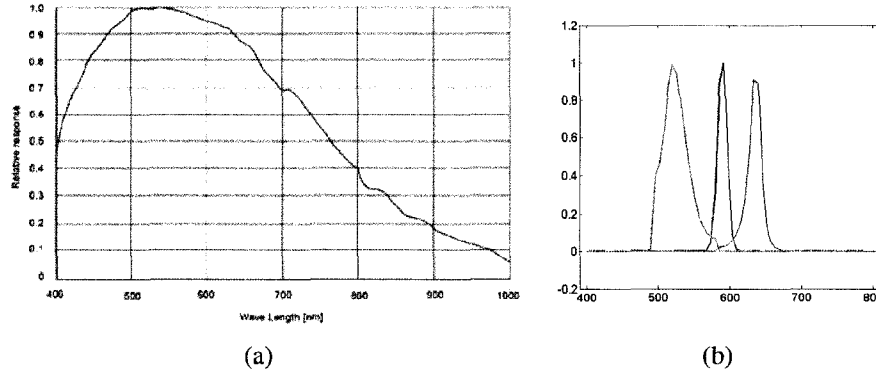


FIG. 3.2 (a) Réponse spectrale de la caméra utilisée, figure tirée de la notice d'utilisation. (b) Spectre relatif d'émission pour le vert (en vert), le jaune (en bleu) et le rouge (en rouge). L'axe des abscisses représente la longueur d'onde en nm.

images par seconde, ce qui est largement suffisant pour l'imagerie optique et pour l'imagerie par speckle, la résolution spatiale du détecteur de la caméra est de $t_p = 6.45 \times 6.45 \mu\text{m}$, et enfin le codage de la sortie en 12 bits permet d'assurer une sensibilité suffisante aux variations de l'intensité de l'image.

Lentille : Le système optique est complété par l'ajout d'une lentille macro de 50 mm fabriquée par Nikkor et ajustable manuellement afin d'augmenter le grossissement et de réduire la profondeur de champ. La caméra et l'objectif sont reliés par un adaptateur C-Mount. La précision en profondeur du système optique dépend de la profondeur de champ (PDC), qui désigne la zone de netteté autour de la distance de mise au point. Son calcul fait intervenir la distance hyperfocale H qui est fonction de la focale de l'objectif f , du nombre d'ouverture ($f/\#$) et du diamètre du cercle de netteté e , qui est défini à partir de la résolution du capteur selon $e = 2t_p = 12.9 \mu\text{m}$.

$$H = \frac{f^2}{f/\# \times e} \quad (3.1)$$

H permet le calcul du premier plan net (PPN) et du dernier plan net (DPN) en fonction

de la distance de mise au point p :

$$\begin{aligned} PPN &= \frac{H \times p}{H + (p - f)} \\ DPN &= \frac{H \times p}{H - (p - f)} \end{aligned} \quad (3.2)$$

Le **grandissement** est défini comme le rapport entre la taille de l'image sur le capteur et la dimension réelle de l'objet, mais aussi celui entre la focale et la distance de mise au point (f/p). Dans notre cas, nous avons mesuré ce rapport en plaçant une référence millimétrique dans l'image, puis en déterminant sa taille en pixel. Nous obtenons ainsi $g = (\text{Taille de l'image sur le capteur}) / (\text{Taille réelle de l'objet}) \approx 0.5$. Nous pouvons alors réécrire les équations (3.2) en fonction du grandissement :

$$\begin{aligned} PPN &= \frac{H}{(H/p + 1) - g} \\ DPN &= \frac{H}{(H/p - 1) + g} \end{aligned}$$

En remplaçant H par sa valeur, puis en développant chaque fraction obtenue au premier ordre par la formule de Taylor :

$$\begin{aligned} PPN &= p - f/\# \times e \times \frac{1 + g}{g^2} \\ DPN &= p + f/\# \times e \times \frac{1 + g}{g^2} \end{aligned}$$

La profondeur de champ s'exprime donc par :

$$\begin{aligned} PDC &= DPN - PPN \\ &= 2f/\# \times e \times (1 + g)/g^2 \end{aligned} \quad (3.3)$$

Avec $f/\# = 3.5$, $g = 0.5$ et $e = 12.9 \mu m$, notre système possède une profondeur de champ de $\approx 150 \mu m$. Notre distance de travail est d'environ 10 cm. Diminuer la profondeur de

champ permet de limiter les artéfacts et notamment ceux dus à la circulation sanguine dans les gros vaisseaux sanguins qui sont en dehors de la zone de netteté du système lorsque nous faisons la mise au point à $-600\ \mu\text{m}$. Néanmoins, cela conduit aussi à la diminution des variations du signal enregistré. Grinvald (1999) préconise l'emploi d'un microscope plutôt que d'un objectif macrophotographique commercial. En combinant deux lentilles de 50 mm en face à face, il atteint un grandissement de 1 et une profondeur de champ de $50\ \mu\text{m}$. Il aboutit cependant à une distance de travail de 3 cm, ce qui peut être problématique dans le cas de la moelle épinière puisque l'accès à la zone imagée est limité par les clampes de fixation et par le positionnement des diodes d'éclairage.

Diodes d'éclairage : Deux des diodes, de couleur verte ($\lambda = 523\ \text{nm}$) et rouge ($\lambda = 637\ \text{nm}$) sont regroupées sur une matrice (Optek OVSPRGBCR4 Power RGB) alors que la diode jaune ($\lambda = 589\ \text{nm}$) est séparée (Optek OVSPxBCR44 Series). La matrice de diodes comprend aussi une diode bleu qui n'est pas utilisée dans cette étude. Le spectre d'émission des diodes utilisées (Rouge, Vert et Jaune) est précisé à la figure 3.2.

Contrôle : La caméra est contrôlée par ordinateur (1) grâce à une interface Labview développée dans la première partie du projet. Cette interface permet en outre d'assurer la synchronisation avec la stimulation via la réception d'un signal TTL envoyé par un autre ordinateur (2) à la fois à la carte d'acquisition de (1) et au stimulateur électrique sur lequel est réglée l'intensité de la stimulation. La synchronisation passe par l'échantillonnage du signal reçu par (1) et la fréquence d'échantillonnage doit satisfaire le critère de Niquist : $T_e < \frac{1}{2} \times T_{\text{haut}}$, avec T_{haut} la durée de l'état haut du signal. On prend $f_e > 200\ \text{Hz}$ puisque $T_{\text{haut}} = 10\ \text{ms}$. Dans la première version du programme, un fichier enregistre toutes les valeurs échantillonnées du signal alors que dans la dernière version, seuls les temps pour lesquels la valeur de la tension dépasse un certain seuil (2 V) sont pris en compte. L'ordinateur (1) contrôle de plus le clignotement des diodes de telle manière qu'une image est enregistrée à chaque fois que la zone est éclairée par une

lumière différente.

Autres : Un micro-manipulateur permet d'assurer la translation verticale du système optique. Il est placé entre le bras articulé et la caméra. Enfin, une cage recouverte de tissu noir permet d'isoler l'expérience de l'éclairage ambiant et l'ensemble du système repose sur une plaque de marbre afin d'éviter les vibrations qui pourraient détériorer la qualité du signal. Il est ainsi crucial de limiter les vibrations à la fois de l'animal, de l'éclairage et de la caméra pendant toute la durée de l'expérience.

3.3 Manipulation du système

Le placement de la caméra au dessus de la zone d'étude se fait grâce à un bras articulé qui assure la rigidité du système lors de l'acquisition. Les diodes lumineuses sont ensuite positionnées de telle manière que l'éclairage de la zone soit le plus uniforme possible. Leurs intensités sont réglées individuellement et de telle sorte que l'ensemble de l'image ne soit ni saturé ni sous exposé. La mise au point est faite sur la surface de la moelle sous un éclairage vert ($\lambda = 525 \text{ nm}$) tout d'abord grossièrement grâce à l'objectif, puis finement avec la translation micrométrique. L'image anatomique est alors acquise. Utiliser la lumière verte, absorbée par l'hémoglobine quelque soit son niveau d'oxygénation, permet de faire ressortir les vaisseaux sanguins et facilite la mise au point. Le système optique est ensuite descendu de $600 \mu\text{m}$, profondeur à laquelle se situent les interneurons comme nous l'avons vu au premier chapitre. La zone est ensuite éclairée par les diodes utilisées lors de l'acquisition.

Plusieurs tests sont nécessaires pour s'assurer que la profondeur réelle permet d'enregistrer l'activation. La précision du système optique détaillée à la partie 3.2 ne permet pas de faire une mise au point suffisamment précise sur les vaisseaux sanguins et cette erreur se répercute directement sur la profondeur d'imagerie. De plus, la position des interneurons n'est pas constante d'un rat à l'autre. Monter ou descendre par pas de $150 \mu\text{m}$

jusqu'à atteindre une profondeur estimée de 300 μm ou de 900 μm permet le plus souvent de trouver la profondeur adéquate. Dans l'autre cas, la mise au point initiale est trop imprécise et doit être refaite. La validité de la réponse est basée sur la ressemblance avec la réponse hémodynamique attendue aussi bien temporellement, une augmentation de la lumière réfléchie quelques secondes après la stimulation suivie d'une diminution dans les quinze secondes, que spatialement, la réponse devant de plus être préférentiellement située du même côté que la stimulation et non pas seulement sur la veine centrale. Ce réglage implique la nécessité de recourir à un ensemble d'acquisitions "tests" avant de commencer la session générale d'enregistrement.

3.4 Protocole de stimulation

Deux protocoles de stimulation ont été mis en place : la stimulation par blocs et la stimulation continue. La stimulation par blocs a été principalement utilisée. Chaque bloc dure 20 secondes afin de permettre à la réponse hémodynamique de redescendre à son niveau d'origine. Pendant la première seconde, le nerf est stimulé électriquement par un train d'impulsions de fréquence 10 Hz et d'amplitude fixée par rapport au seuil. Pendant les 19 autres secondes, le nerf est au repos et aucune stimulation n'est appliquée.

Chaque impulsion dure 10 ms, valeur qui est élevée par rapport à la littérature qui préconise plutôt des valeurs variant autour de 0.5 ms. La valeur du seuil est quant à elle déterminée en augmentant progressivement l'intensité de la stimulation jusqu'à atteindre celle pour laquelle le muscle se contracte. Elle est relativement constante et se situe autour de 0.03 mA pour une impulsion de 1 ms, et autour de 0.008 mA pour une impulsion de 10 ms.

Le deuxième protocole est la stimulation continue. Les stimulations sont espacées de 6.4 secondes ($f = 0.156 \text{ Hz}$), ce qui permet d'assurer que la fréquence sera visible dans le

spectre de Fourier. En effet, les bruits physiologiques tels que la régulation du système sympathique à 0.4 Hz, la respiration à 1.3 Hz et les battements cardiaques à 7.5 Hz n'ont pas d'influence sur l'amplitude du spectre à 0.156 Hz. Le choix de la fréquence de stimulation est en fait issu d'un compromis entre la plage des fréquences disponibles compte tenu des bruits et du temps minimum pour que la réponse revienne à son niveau initial. Mis à part le temps de stimulation de 0.5 s et la fréquence de stimulation à 2 Hz, les autres paramètres restent identiques à ceux utilisés pour la stimulation par blocs.

3.5 Influence du choix de l'anesthésiant

Le choix de l'anesthésiant peut influencer l'activation neuronale mais cependant tous les articles traitant de ce sujet ne s'accordent pas sur quel produit utiliser. Plusieurs anesthésiants sont ainsi utilisés dans la littérature aussi bien dans les études fonctionnelles en IRM que dans les travaux d'imagerie optique : l'uréthane chez Devor et al. (2003); Dunn et al. (2001, 2003); Hewson-Stoate et al. (2005); Sasaki et al. (2002), la kétamine chez Malonek and Grinvald (1996) ou encore l'halotane chez Sheth et al. (2003); Dunn et al. (2005); Lawrence and Stroman (2007) et l'alphachloralose chez Lawrence et al. (2004); Malisza and Stroman (2002); Zhao et al. (2007).

Nous avons commencé notre étude en utilisant de la kétamine parce que cet anesthésiant permet d'aboutir à de bons résultats dans le cortex (Malonek and Grinvald, 1996) et qu'il est facilement administrable à l'animal. Cependant, suite à une lecture plus approfondie de la littérature, il apparaît que cet anesthésiant provoque une diminution de l'activation (Castroman and Ness, 2001; Hua et al., 2000). Ces deux dernières études montrent en effet par électrophysiologie extra-cellulaire que la kétamine inhibe la réponse neuronale de la moelle épinière dépendamment de sa concentration. L'alphachloralose est au contraire l'un des anesthésiques préservant le plus le couplage neuro-vasculaire d'après Ueki et al. (1992). Il le distingue d'autres produits, tels que le pentobarbital, l'halothane et l'oxyde

nitrique qui suppriment ou modifient complètement la réponse métabolique dans le cortex. Cette réponse est initiée par la stimulation de la patte arrière contra-latérale à la zone observée et est mesurée par électrophysiologie et par la comparaison du taux d'utilisation du glucose dans les cortex somatosensoriels droit ou gauche. Il mentionne de plus que la forme de l'activation métabolique sous alphachloralose reste identique par rapport à l'état de réveil, même s'il observe également une baisse du nombre de neurones recrutés. Ce produit est couramment utilisé dans les articles étudiant l'activation neuronale dans la moelle épinière en IRM : Lawrence et al. (2004); Malisza and Stroman (2002); Zhao et al. (2007). Nous avons cependant noté une augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle de l'animal.

L'étude de Martin et al. (2006) compare la réponse hémodynamique dans le cortex selon que l'animal est éveillé ou anesthésié. Même si nous n'utilisons pas le même anesthésique et que nous n'étudions pas la même zone, il est intéressant d'étudier l'impact général d'un anesthésique sur les caractéristiques de la réponse. Les changements dans la concentration en oxygène y sont mesurés par imagerie optique, les changements dans le flux sanguin par laser Doppler, et les changements dans l'activité neuronale par électrophysiologie. Les auteurs observent alors un allongement de l'ordre d'une seconde du temps de latence entre la stimulation et le pic maximal, et une diminution de l'amplitude (Figure 3.3(a)). De plus, le couplage entre la réponse hémodynamique et la réponse neuronale n'est plus linéaire comme le montre la figure 3.3.

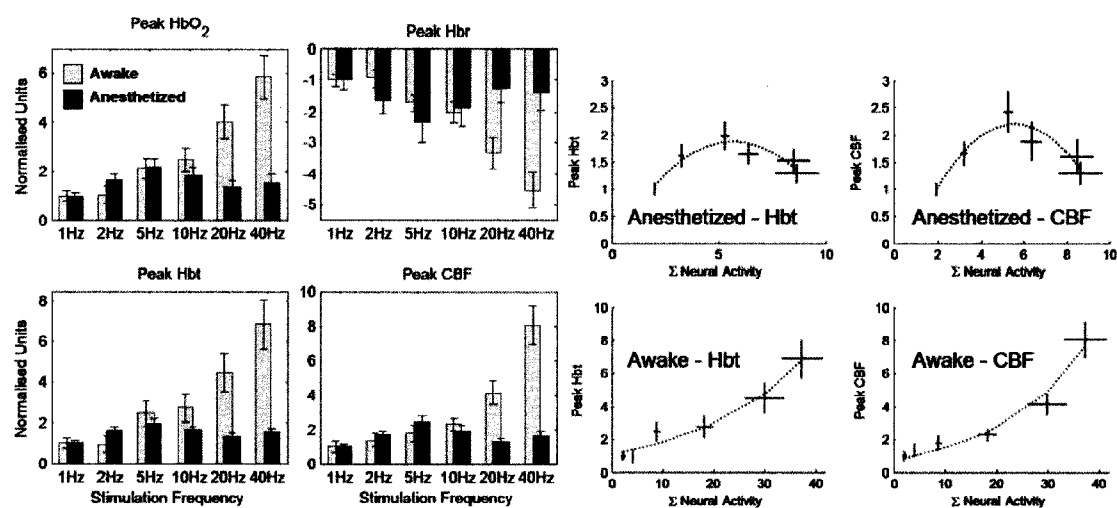


FIG. 3.3 Modification des caractéristiques de la réponse hémodynamique suite à l'injection d'uréthane (Martin, 2006) : diminution de l'amplitude (a) et non linéarité du couplage neuro-métabolique (b).

CHAPITRE 4

ANALYSE SPATIOTEMPORELLE DES DONNÉES

4.1 Mise en évidence du problème

L'imagerie optique nécessite la détection de variations d'intensité comprises entre 0.1 et 2%. Le problème consiste à limiter l'influence du bruit, issu de la caméra et de la physiologie, par rapport à la force du signal .

Le bruit physiologique contient la respiration, les battements cardiaques et d'autres ondes plus difficilement identifiables. La respiration entraîne un mouvement de la cage thoracique de l'animal et par conséquent de la moelle épinière, ce qui induit une modification des distances entre la moelle et le point focal du système optique et entre la moelle et les diodes d'éclairage. Cela implique respectivement un changement de la mise au point et une variation de l'intensité réfléchie mesurée. La fréquence de ces variations est néanmoins connue précisément, l'animal étant branché sur un respirateur à environ 70 battements par minute (≈ 1.3 Hz), ce qui facilite leur suppression. Les battements cardiaques ont une fréquence élevée de 400 battements par minute chez le rat (≈ 6 Hz) et ont pour effet de modifier la concentration sanguine en oxygène, l'absorbance du milieu, et donc l'intensité réfléchie. Ils ne provoquent par contre qu'un très faible mouvement de la moelle. Grinvald (1999) affirme que les bruits ayant la plus grande influence sur le signal d'imagerie intrinsèque sont les oscillations lentes qui sont regroupées sous le nom d'onde de Mayer. Ces ondes ont une fréquence caractéristique située aux alentours de 0.4 Hz chez le rat contre 0.1 Hz chez l'humain et se traduisent par des oscillations rythmiques de la pression artérielle sanguine et du rythme cardiaque, due entre autres à la modification du tonus des muscles vasomoteurs contrôlés par le système sympathique et parasympathique, et donc à la variation de la résistance des artères, du volume et du

flux sanguin (Julien, 2006; Betram et al., 2000). Son origine plus précise est cependant encore débattue et deux hypothèses principales sont actuellement formulées pour l'expliquer : la présence d'un oscillateur endogène situé dans le système nerveux central ou d'une boucle réflexe barométrique qui conduirait à l'installation d'une onde résonante et auto-alimentée de la pression artérielle (Julien, 2006).

Le bruit de la caméra comprend le bruit noir, le bruit photonique et le bruit de lecture.

Le bruit noir est caractéristique des caméras CCD qui convertissent les photons reçus en électrons. Cependant, ces derniers ne sont pas seulement produits par la lumière mais peuvent être issus d'un échauffement de la caméra, surtout lorsque sa température n'est pas contrôlée.

Le bruit photonique résulte du caractère aléatoire du taux d'émission des photons. En effet, l'émission de lumière est un processus stochastique suivant une distribution de Poisson, et les variations observées peuvent également être dues aux fluctuations temporelles de la quantité de lumière émise d'après Grinvald et al. (1999). Le nombre de photons qui peuvent être attribués aux fluctuations réelles est égal à la racine carrée du nombre total de photons captés. Ainsi, pour assurer l'observation de variations de 0.1%, plus de 1 000 000 de photons sont nécessaires. Le rapport signal sur bruit est alors déterminé à partir du rapport entre le nombre de photons nécessaires et le nombre de photons disponibles. Ce dernier dépend de la capacité de la caméra qui est définie comme le nombre maximal de photons pouvant s'accumuler sur les capteurs avant d'atteindre la saturation. Les spécifications de la caméra utilisée indiquent que l'illuminance standard est de 400 Lux, ce qui correspond à une intensité de 10^{12} photons. Ce bruit semble donc être négligeable. *Le bruit de lecture* regroupe l'ensemble des bruits inhérents au processus de conversion du nombre d'électrons en un signal analogique, puis en un signal numérique envoyé en sortie de la caméra.

Les spécifications données dans la notice de la caméra ne permettent cependant pas de

quantifier l'importance des bruits. Nous avons donc choisi de valider l'utilisation du système par des tests, décrits dans la partie 5.1.1.

4.2 Analyse des données en stimulation par blocs

Notre système permet d'acquérir des images ayant une haute résolution (300x1000 pixels) et une grande sensibilité (12bits). La rapidité d'acquisition (15Hz actuellement) et la durée d'une expérience (10 min) implique une consommation importante d'espace physique. Ainsi, une acquisition génère 9000 images et près de 3 Go. Sur l'ensemble des acquisitions effectuées au cours de ce travail, plus de 800 Go de données ont été stockées.

L'analyse des données comprend deux grandes étapes : tout d'abord le calcul des moyennes des matrices de variations relatives ou absolues, puis leur traitement en vue de faire ressortir l'évolution temporelle ainsi que les régions propres à la réponse. L'ensemble des techniques utilisées est résumé à la figure 4.1.

4.2.1 Première étape : calcul des matrices d'absorbance et de vitesse

Principe : Nous déterminons les matrices de variations absolues I_a et relatives I_r de l'intensité $I(t)$ par rapport à l'image de référence I_0 . Cette dernière est constituée par la moyenne des images acquises pendant la période de repos de chaque bloc. I_r et I_a s'écrivent respectivement :

$$\begin{aligned} I_r &= \frac{I - I_0}{I_0} \\ I_a &= \frac{I}{I_0} \end{aligned} \quad (4.1)$$

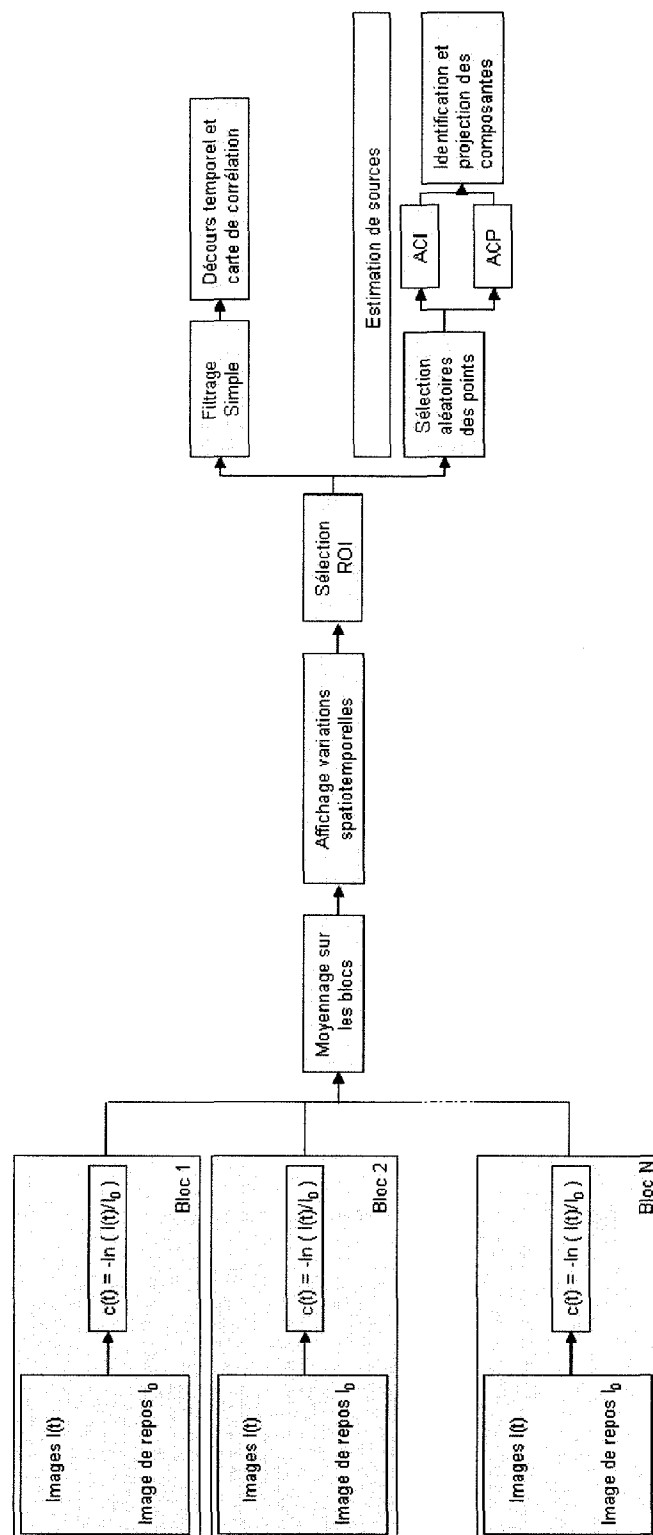


FIG. 4.1 Ensemble de la chaîne d'analyse par blocs des données.

Les variations absolues d'intensité permettent de déterminer directement les variations en absorbance d'après la loi de Beer Lambert (2.6). La construction de la matrice des variations relatives de flux nécessite une étape supplémentaire qui vise à transformer les images brutes en images de vitesse. Une fois ces images obtenues, on peut évaluer la variation relative en vitesse, définie par :

$$\nu_r = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \quad (4.2)$$

Nous appliquons ensuite un moyennage successif par blocs de ces matrices afin d'obtenir $\widehat{I_r(t)}$, $\widehat{I_a(t)}$ et $\widehat{\nu_r(t)}$. Dans la suite, seule la notation $I(t)$ sera conservée. Cette technique d'estimation repose sur le fait que la stimulation, la réponse et les variations en absorbance et en vitesse consécutives interviennent de manière périodique et attendue alors que les variations dues aux bruits arrivent de manière aléatoire et sont donc décorréliées avec les stimulus. On suppose de plus que le signal recherché $I(t)$ est stationnaire de bloc en bloc et qu'il n'est donc pas affecté par le moyennage, mais aussi que les bruits sont additifs et de moyenne nulle. Alors, le signal observé au bloc n pour un temps après stimulation t , s'écrit en fonction du signal I et du bruit b : $I(n, t) = I(t) + b(nT + t)$, et l'estimé par moyennage du signal recherché $\widehat{I(t)}$:

$$\widehat{I(t)} = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} I(n, t) \quad (4.3)$$

En développant l'expression du signal dans l'équation précédente et en utilisant la propriété de stationnarité de $I(t)$, on obtient :

$$\widehat{I(t)} = I(t) + \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} b(nT + t) \quad (4.4)$$

En moyennant le signal sur un nombre de blocs N suffisant, la composante de bruit tend à s'annuler au profit de la réponse et dans le cas idéal où on dispose d'un nombre infini

de blocs, le signal estimé correspond exactement à la réponse.

Supposons maintenant que le signal sur un bloc est une variable aléatoire suivant une loi de Poisson sur n . Alors, l'écart type est égal à la racine carrée de sa moyenne $\sigma = \sqrt{I(t)}$.

Or, la somme de N variables aléatoires indépendantes suivant une loi de Poisson suit également une loi de Poisson de moyenne $I(t)_N = NI(t)$ et d'écart type $\sigma_N = \sqrt{NI(t)}$.

Le rapport signal sur bruit est alors égal à :

$$\begin{aligned}
 SNR_N &= \frac{I(t)_N}{\sigma_N} \\
 &= \frac{N \times I(t)}{\sqrt{NI(t)}} \\
 &= \sqrt{NI(t)} \\
 &= \sqrt{N} \times SNR
 \end{aligned}$$

et est augmenté d'un facteur $\sqrt{N}$ après N moyennages.

Le nombre de moyennages est limité par la durée de l'acquisition et par la taille des données que nous pouvons sauvegarder. Les acquisitions durent neuf minutes et 27 blocs sont enregistrés pendant cette durée, ce qui conduit à une augmentation théorique du SNR d'un facteur 5.2

Nous pouvons remettre en question les hypothèses formulées auparavant, à savoir que premièrement, il arrive que les rythmes physiologiques de l'animal se synchronisent avec la stimulation et que dans ce cas l'hypothèse de décorrélation ne tient plus, et que deuxièmement, la réponse hémodynamique n'est pas tout à fait constante, les paramètres physiologiques (CO_2 et rythme cardiaque) n'étant pas strictement stables pendant la durée de l'expérience, notamment à cause du niveau variable d'anesthésie. Sur-tout, l'hypothèse que le signal pour un temps t fixé $I(t)$ suive une loi de Poisson est très peu vraisemblable vu le nombre limité de moyennages considérés.

Programmation : Sous Matlab, le signal de synchronisation, enregistré dans un fichier texte, est analysé afin d'obtenir le temps de chaque stimulation. Le fichier Frame.txt associe à chaque image son numéro, la couleur de l'éclairage utilisé lors de l'acquisition, et le temps auquel elle est acquise. Pour chaque stimulation, nous sélectionnons les numéros des images qui ont été acquises pendant les trois secondes précédentes et ceux de celles prises pendant les 17 secondes suivantes. Les images sont ensuite lues grâce à ce numéro et à la couleur de l'éclairage utilisé. L'image de baseline est construite, puis on ajoute à la matrice les variations par rapport à ce baseline des images sélectionnées en fonction de leur temps d'acquisition relatif à la dernière stimulation. Dans le cas où la k ème image n'a pas été correctement acquise, ou dans celui où la variation par rapport au baseline, moyennée sur l'ensemble des points de l'image, est trop importante par rapport à celle attendue ($> 5\%$), l'image n'est pas prise en compte et est remplacée par l'image de secours. Cette dernière consiste à la dernière image acquise ($k-1$, $k-2$, etc...) qui satisfasse aux deux critères énoncés ci-dessus. Dans le cas où la première image du bloc n'y répond pas, on considère l'image de baseline comme image de secours. Cette technique de rejet d'image permet de supprimer les problèmes ponctuels de l'acquisition et d'éviter qu'une erreur sur une seule image ne vienne perturber le résultat de l'ensemble du moyennage. La moyenne obtenue est filtrée spatialement par un filtre passe bas gaussien de taille 10 et d'écart type 2 pour diminuer l'influence du bruit de la caméra.

4.2.2 Deuxième étape : traitement des matrices des variations

Les traitements décrits dans cette partie sont appliqués aux matrices d'absorbance ΔA ou de vitesse $\frac{\nu - \nu_0}{\nu_0}$.

4.2.2.1 Méthode simple par filtrage

La première analyse est l’affichage de l’évolution spatiotemporelle de la matrice des variations. Elle permet de situer approximativement la zone d’activation et de choisir la région d’intérêt (ROI) qui sera utilisée à la fois pour déterminer les caractéristiques temporelles et spatiales de la réponse. La ROI est sélectionnée manuellement sur l’image anatomique et correspond à la zone non veineuse où les changements sont les plus importants.

4.2.2.1.1 Caractéristiques temporelles La première estimation du décours temporel est calculée en moyennant les évolutions temporelles des points de la ROI. Ce signal est cependant encore bruité, notamment à cause des oscillations provoquées par la respiration comme le montre son spectre de Fourier. Nous avons utilisé un filtre passe bas de Chebyshev d’ordre 2 (fonction matlab *cheby1*) dont la fréquence de coupure est choisie inférieure à la fréquence de respiration (typiquement $f_c = 0.3$ Hz). Le choix du filtre de Chebyshev par rapport à d’autres filtres utilisés se base sur une très bonne sélectivité de la fréquence (par rapport aux filtres de Butterworth notamment), même si la réponse en fréquence peut présenter des oscillations dans la bande passante.

4.2.2.1.2 Caractéristiques spatiales Le signal hémodynamique est un phénomène physiologique caractérisé à la fois par son évolution temporelle et par sa localisation spatiale. Cette dernière est obtenue par les méthodes suivantes :

- 1. Par simple seuillage des variations : nous construisons un masque en associant la valeur 1 aux pixels dont la valeur est supérieure ou égale à une demi fois le maximum du décours temporel estimé dans la ROI , et la valeur 0 aux autres. La carte temporelle peut de plus être calculée en associant à chaque pixel le temps pour lequel sa variation

est maximale. Cette technique ne garantit néanmoins pas que les points inclus dans la zone d'activation suivent un décours temporel dont la forme correspond à une réponse hémodynamique.

- 2. La deuxième méthode consiste à construire la carte de corrélation temporelle. A chaque point de l'image, nous calculons grâce à la fonction Matlab *corrcoeff* le coefficient de corrélation C_{ij} entre le décours temporel moyen de la ROI, ΔA_{ROI} , et le décours en ce point, ΔA_{ij} . C_{ij} est défini par le rapport entre la covariance des deux vecteurs et du produit de leur écarts types :

$$C_{ij} = \frac{\text{cov}(A_{ROI}, A_{ij})}{\sigma_{ROI}\sigma_{ij}} \quad (4.5)$$

C_{ij} est compris entre -1 et 1 et mesure la linéarité de la relation entre les deux vecteurs A_{ROI} et A_{ij} . Ainsi, les deux bornes sont atteintes lorsque les deux vecteurs sont linéairement liés par un coefficient respectivement négatif et positif. Dans le cas où ils sont indépendants, le coefficient est nul. La carte de corrélation représente donc la ressemblance de l'évolution temporelle en chaque point avec le décours supposé de l'activation.

- 3. La dernière méthode ne tient cependant pas compte de l'évolution temporelle du signal. En deux points différents de l'image, la réponse peut être décalée temporellement. N'étant pas une opération linéaire, le décalage ne sera pas pris en compte par le calcul de la carte de corrélation. Il s'agit donc de construire une mesure de la ressemblance entre A_{ROI} et A_{ij} qui soit également efficace si les deux signaux sont décalés dans le temps. La corrélation croisée Γ_{XY} entre deux signaux X et Y, calculée à l'aide de la fonction *xcorr* de Matlab, répond à cette problématique. Elle correspond en effet à un estimateur au sens de maximum de vraisemblance de la solution comme il est précisé dans Goussard (2007). Elle est définie dans le cas discret par :

$$\Gamma_{XY}(k) = E[X(n+k)Y(n)] \quad (4.6)$$

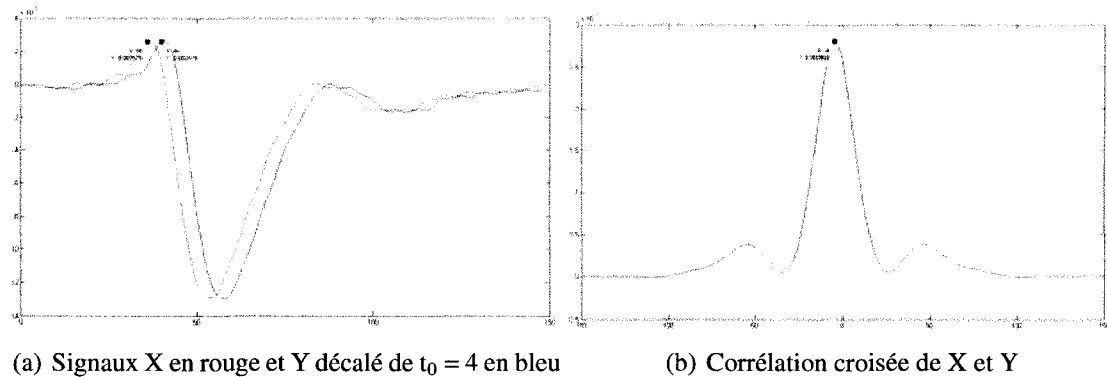


FIG. 4.2 Calcul de la corrélation croisée pour retrouver le décalage temporel entre X et Y.

qui est fonction du temps relatif k entre les deux signaux. Γ_{XY} est maximale lorsque la ressemblance entre le signal X retardé et le signal Y original est également maximale. Le maximum de Γ_{XY} renseigne alors à la fois sur la ressemblance entre X et Y et sur l'avance ou le retard temporel de X par rapport à Y. Prenons l'exemple de deux signaux : X et $Y = X(t-t_0)$ en retard de t_0 sur Y. Comme le montre la figure 4.2, la corrélation croisée de ces deux signaux permet de mesurer le décalage temporel et donc de retrouver t_0 qui est donné par l'indice du maximum de Γ_{XY} . Un retard de Y par rapport à X se traduit par une valeur négative de t_{max} , défini par le temps du maximum de Γ_{XY} .

Pour appliquer cette méthode à un problème 2D, nous calculons en chaque point (i, j) la corrélation croisée $\Gamma_{YX_{ij}}(k)$ entre le signal X_{ij} enregistré à ce point et un signal de référence Y, puis déterminons les caractéristiques de son maximum. Nous obtenons alors deux cartes : une carte des valeurs maximales qui renseigne sur la ressemblance avec la réponse supposée et une carte des décalages temporels. Afficher ces deux informations sur la même image, en codant la première par l'intensité et la deuxième par un ensemble de 256 couleurs, permet de mieux interpréter les résultats obtenus. Pour tester cette méthode, quatre signaux sont considérés : le signal X déjà utilisé, le signal Y1 en retard de 4 par rapport à X, le signal Y2 en retard de 19 et le signal Y3 qui est aléatoire. Une matrice test est alors créée en répartissant ces quatre signaux, dans l'image (X de 1

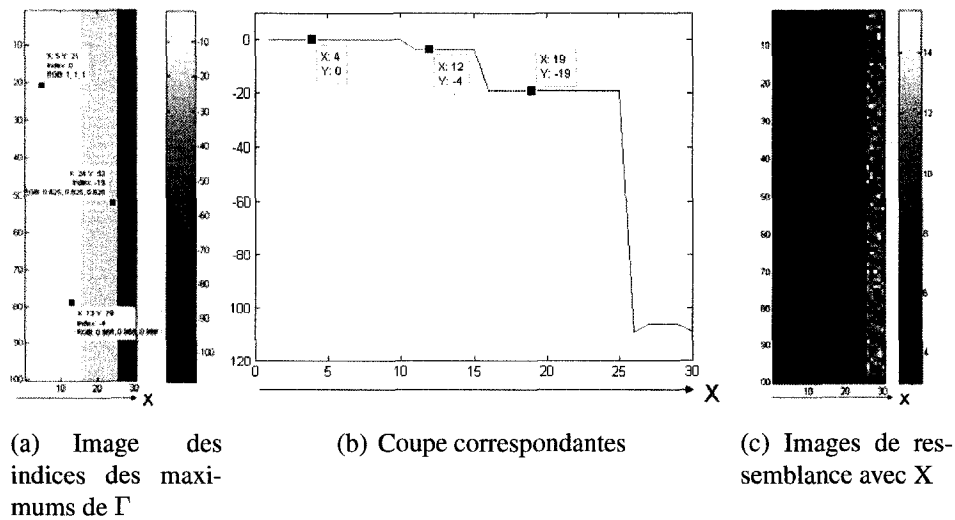


FIG. 4.3 Calcul de la corrélation croisée pour retrouver le décalage temporel au sein d'une image.

à 10 pixels, Y1 de 11 à 15 pixels, Y2 de 15 à 25, et Y3 de 25 à 30). Le résultat du calcul de l'image des maximums est affiché à la figure 4.3 et montre qu'il est possible dans le cas parfait de retrouver la dynamique temporelle dans l'image.

4.2.2.2 Méthodes d'estimation de sources

Le but de l'application de ces méthodes est toujours de déterminer l'évolution temporelle ainsi que la surface caractéristique de la réponse. Elles ont été utilisées plus particulièrement lors des premières expériences pour lesquelles le signal était plus difficilement exploitable de manière directe.

Nous construisons un ensemble de variables aléatoires et un ensemble associé d'observations : une variable aléatoire est définie par la valeur de la variation de l'absorbance pour un temps t donné soit $\Delta A(t)$, dont une observation, notée dans la suite $(x_i)_{i \leq n}$, est cette variation en un point de l'image. A chaque variable aléatoire est donc associé un nombre d'observations égal au nombre de points sélectionnés. Cette sélection est aléatoire afin de limiter la taille des données à traiter et le temps de calcul.

Le principe de la méthode d'estimation de sources est de supposer que les vecteurs observations $(x_i)_{i \leq n}$ sont des combinaisons linéaires de n autres vecteurs, les vecteurs sources $(s_i)_{i \leq n}$ que nous souhaitons déterminer.

$$\forall i \leq n, x_i = a_{i1}s_1 + a_{i2}s_2 + \dots + a_{in}s_n \quad (4.7)$$

Notons A la matrice de mélange constituée par les coefficients a_{ij} , X et S les matrices dont les colonnes respectives sont les vecteurs observations et les vecteurs sources, puis écrivons le problème sous sa forme matricielle : $X = A S$. Nous souhaitons alors trouver à la fois A et S . Pour cela, deux méthodes classiques d'analyse multivariée sont utilisées : la **décomposition en composantes principales (ACP)** et la **décomposition en composantes indépendantes (ACI)** qui diffèrent par les propriétés supposées des sources.

4.2.2.2.1 Analyse en composantes principales Dans le cas de l'analyse en composantes principales, le choix de la matrice vise à maximiser la décorrélation des sources, les composantes principales, qui sont notées dans ce paragraphe $(U_1, U_2, \dots, U_n)$. La description du principe de l'analyse en composantes principales est tirée de Flury (1988). Elles vérifient chacune :

$$U_i = a'X \quad (4.8)$$

tel que la variance de U soit aussi grande que possible et que $\|a\| = aa' = 1$. Cette contrainte sur a vise à définir le problème (4.8) en ne considérant pour U_i que des combinaisons linéaires normées des vecteurs observations.

La variance de U_i , que nous cherchons à maximiser, s'exprime par : $\text{Var}(U_i) = \text{Var}(a'X) = a'\Psi a$, avec Ψ la matrice de covariance de X , définie par $\Psi = E[XX']$. La matrice de covariance Ψ est une matrice réelle symétrique et il existe donc, d'après le théorème de décomposition spectrale, une matrice orthonormale B et une matrice diagonale Δ qui

vérifient $\Psi = B\Delta B'$ et $B'\Psi B = \Delta$. L'ensemble des coefficients diagonaux de Δ sont notés $(\lambda_i)_{i \leq n}$ et sont classés dans l'ordre croissant : $\lambda_1 \leq \lambda_2 \leq \dots \leq \lambda_n$. B étant une matrice orthonormale, ses vecteurs colonnes $(b_1, b_2, \dots, b_n)$ forment une base de l'espace $\mathbb{R}^n$ et constituent les vecteurs propres de Ψ , associés aux valeurs propres $(\lambda_i)_{i \leq n}$. En notant $(\alpha_1, \dots, \alpha_n)$ les coordonnées de $\mathbf{a}$ dans cette nouvelle base,

$$\mathbf{a} = \alpha_1 b_1 + \alpha_2 b_2 + \dots + \alpha_n b_n = B\alpha \quad (4.9)$$

En reprenant l'expression $\text{Var}(U_i)$, et en utilisant les différentes propriétés énoncées ci dessus,

$$\begin{aligned} \text{var}(U_i) &= \mathbf{a}'\Psi\mathbf{a} \\ &= \alpha' B^T \Psi B \alpha \\ &= \alpha' \Delta \alpha \\ &= \sum_{j=1}^n \lambda_j \alpha_j^2 \\ &\leq \lambda_1 \sum_{j=1}^n \alpha_j^2 \\ \text{var}(U) &\leq \lambda_1 \end{aligned} \quad (4.10)$$

Ainsi, la contrainte $\mathbf{a}\mathbf{a}' = \sum_{j=1}^n \alpha_j^2 = 1$ garantit que la variance est bornée par λ_1 . Cette borne est atteinte lorsque $\alpha_1 = 1$ et que $\forall j \neq 1, \alpha_j = 0$, soit pour $\mathbf{a} = b_1$. La première composante principale est donc :

$$U_1 = b_1' X \quad (4.11)$$

Le calcul des autres composantes principales est soumis à la fois à la maximisation de leur variance propre et à la décorrélation avec les composantes déjà déterminées. Pour le calcul de la k^{ieme} composante U_k , nous voulons donc trouver $\mathbf{a}$ qui maximise $\mathbf{a}'\Psi\mathbf{a}$ sous la condition $\mathbf{a}\mathbf{a}' = 1$, tout en s'assurant de plus que $(\forall j < k, \text{Corr}(U_k, U_j) = 0)$, c'est à

dire que : $\forall j < k, a' \Psi \beta_j = 0$. Or, comme $\forall j < k, \beta_j$ est un vecteur propre de Ψ ,

$$\forall j < k, \Psi \beta_j = \lambda_j \beta_j \quad (4.12)$$

et par conséquent $\forall j < k, a' \beta_j = 0$, c'est à dire que $\mathbf{a}$ est orthogonal aux vecteurs $(\beta_j)_{j < k}$ et que donc $\forall j < k, \alpha_j = 0$. La variance de U_k est alors égale à :

$$\begin{aligned} \text{var}(U) &= \text{var}(a' X) \\ &= \sum_{j=1}^n \lambda_j \alpha_j^2 \\ &= \sum_{j=k}^n \lambda_j \alpha_j^2 \\ &\leq \lambda_k \sum_{j=k}^n \alpha_j^2 \\ \text{var}(U_k) &\leq \lambda_k \end{aligned} \quad (4.13)$$

De même que pour le calcul de la première composante, la variance atteint son maximum lorsque $\mathbf{a} = \mathbf{b}_k$. La k^{ieme} composante principale est donc :

$$U_k = b_k' X \quad (4.14)$$

La base de l'espace des composantes principales est formée par les colonnes de $\mathbf{B}$, matrice de passage entre la matrice de corrélation de $\mathbf{X}$ et la matrice diagonale correspondante. Les vecteurs U_k forment eux les composantes principales de $\mathbf{X}$ et constituent les sources que nous voulions estimer. La décomposition en composantes principales utilise la fonction Matlab *princomp* qui retourne les vecteurs de base b_k , les composantes principales U_k et les valeurs propres de la matrice de covariance de $\mathbf{X}$.

4.2.2.2.2 Analyse en composantes indépendantes Le but de l'ACI est de maximiser l'indépendance des vecteurs sources et non plus leur simple décorrélation. Cette nouvelle

hypothèse est plus forte puisque la décorrélation est une condition nécessaire mais non suffisante à l'indépendance. Mathématiquement et d'après Cardoso (2002), la formulation du problème de maximisation de l'indépendance des sources consiste à trouver la matrice de séparation W telle que :

$$W = \min \mathfrak{S}(A^{-1}X) \quad (4.15)$$

avec $\mathfrak{S}(Y)$ une mesure de la dépendance des coordonnées d'un vecteur aléatoire Y . Cela garantit, si une solution existe, que les vecteurs $y = w'X$:

$$\begin{aligned} y_1(t) &= w_{11}x_1(t) + w_{12}x_2(t) + \dots + w_{1n}x_n(t) \\ y_2(t) &= w_{21}x_1(t) + w_{22}x_2(t) + \dots + w_{2n}x_n(t) \\ &\vdots \\ y_n(t) &= w_{n1}x_1(t) + w_{n2}x_2(t) + \dots + w_{nn}x_n(t) \end{aligned} \quad (4.16)$$

soient les plus indépendants possible. On obtient alors que :

$$Y(t) = WX(t) = WAS(t) = ZS(t) \quad (4.17)$$

L'algorithme utilisé (FastICA), développé sous Matlab par l'un des laboratoires (CIS) du Département d'informatique de l'Université Technologique d'Helsinki en Finlande, est décrit dans les articles Hyvarinen and Oja (1997); Hyvarinen (1999) et est disponible à l'adresse <http://www.cis.hut.fi/projects/ica/fastica/>. L'information mutuelle sert de mesure de dépendance et est minimisée par un algorithme de point fixe qui ne sera pas détaillé dans ce travail. Il se limite à expliquer la mesure utilisée par les auteurs. L'entropie d'une variable aléatoire Y représente la quantité d'information acquise par son observation. Elle est définie à partir de sa fonction de répartition $f(y) = P(Y=y)$

selon :

$$H(y) = - \int f(y) \ln(f(y)) dy \quad (4.18)$$

Or, l'entropie d'une variable aléatoire gaussienne est maximale parmi toutes les autres variables aléatoires de variance égale. Ainsi, l'entropie peut servir de mesure du caractère non gaussien de sa distribution. Nous allons maintenant relier la notion de non gaussianité avec le concept d'indépendance. D'après le théorème central limite, la somme de n variables aléatoires indépendantes converge vers une gaussienne lorsque n tend vers l'infini. La somme de deux variables aléatoires a une distribution intuitivement plus proche d'une loi gaussienne que n'importe laquelle des variables aléatoires originales. Le signal y_j étant une combinaison linéaire des $(s_i(t))_{i < n}$ d'après (4.17), sa ressemblance avec une gaussienne est minimale s'il est égal à l'une des composantes indépendantes. En effet, s'il n'était pas égal à l'un des $(s_i(t))_{i < n}$, il pourrait s'exprimer comme une combinaison linéaire des $(s_i(t))_{i < n}$, puisque ces derniers forment une base de l'espace, et ressemblerait davantage à une gaussienne.

La fonction suivante définit une mesure de ressemblance gaussienne nulle pour une variable aléatoire gaussienne et positive autrement, et peut donc servir de mesure d'indépendance : plus une variable aléatoire est indépendante des autres variables, plus cette mesure est grande. Elle est appelée négentropie :

$$J(y_i) = H(y_{gauss}) - H(y_i) \quad (4.19)$$

avec y_{gauss} une variable aléatoire gaussienne ayant la même variance que y_i . Cette expression est approchée par :

$$J(y_i) \approx c[E(G(y_i)) - E(G(\nu))]^2 \quad (4.20)$$

Avec c une constante, E la moyenne de la variable aléatoire, G une fonction non quadratique appelée fonction de contraste, et ν une variable aléatoire gaussienne norma-

lisée. Pour estimer une composante indépendante, l'algorithme FastICA maximise la négentropie du vecteur $w'X$.

4.2.2.2.3 Projection des composantes Les composantes obtenues sont séparées selon qu'elles semblent appartenir au signal recherché ou à d'autres fluctuations physiologiques.

Dans le premier cas, le décours temporel estimé correspond directement à la composante et la carte d'activation à la projection de la matrice des variations sur le vecteur de base c_i correspondant :

$$P_i = \langle X, c_i \rangle c_i \quad (4.21)$$

Dans le second cas, on cherche à supprimer l'influence des composantes indésirables. Dans la base des $(c_i)_{i \leq n}$, le décours temporel en n'importe quel point (i, j) de l'image s'écrit :

$$\forall(i, j), X(i, j) = P_1(i, j) \times c_1 + P_2(i, j) \times c_2 + \dots + P_n(i, j)c_n \quad (4.22)$$

et supprimer la k^{eme} composante permet d'estimer la matrice d'absorbance débruitée $\hat{X}$:

$$\forall(i, j), \widehat{X(i, j)} = X(i, j) - P_k(i, j) \times c_k \quad (4.23)$$

4.3 Analyse des données en stimulation continue

4.3.1 Principe

Le protocole de stimulation continue a été expliqué à la partie 3.4. Son but est de permettre de visualiser la réponse dans le domaine de Fourier en isolant les événements qui apparaissent à la même fréquence que la stimulation. Chacune d'elle est suivie par une

augmentation de l'absorbance et une diminution de l'intensité qui devrait intervenir par conséquent de manière également périodique, suivant la même période que la stimulation. En chaque point de l'image, nous calculons la transformée de Fourier discrète de l'évolution temporelle de l'intensité sur 15 minutes qui s'écrit en chaque point (x, y) en fonction de $\omega_N = e^{\frac{-2\pi i}{N}}$:

$$TF(I_{x,y})(k) = \sum_{j=1}^N I_{x,y}(j) \omega_N^{(j-1)(k-1)} \quad (4.24)$$

$$= |TF(I_{x,y})| e^{i\phi(TF(I_{x,y}))} \quad (4.25)$$

Le signal enregistré est issu à la fois de la réponse hémodynamique $hrf(t)$ répétée toutes les $T_s = 6.4$ s, à laquelle s'ajoute le bruit physiologique de respiration et de battement cardiaque b_r et b_c intervenant à des périodes respectives T_r et T_c , ainsi que le bruit de la caméra supposé blanc : b_{cam} . Nous obtenons donc le signal :

$$\begin{aligned} S(t) = & hrf(t) * \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \delta(t - nT_s) + b_c * \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \delta(t - nT_c) \dots \\ & \dots + b_r * \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \delta(t - nT_r) + b_{cam} \end{aligned}$$

De plus, la durée de l'acquisition étant limitée à $T_{acq} = 15$ min, le signal précédant est multiplié par un rectangle de largeur T_{acq} . La transformée de Fourier du signal enregistré, en omettant les constantes multiplicatives consécutives, est :

$$\begin{aligned} TF_S(\nu) = & [TF_{hrf}(\nu) \times \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \delta(\nu - \frac{n}{T_s}) + b_c \times \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \delta(\nu - \frac{n}{T_c}) \dots \\ & \dots + b_r \times \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \delta(\nu - \frac{n}{T_r}) + b_{cam}] * sinc(\pi\nu \frac{T_{acq}}{2}) \end{aligned}$$

4.3.2 Spectre de Fourier

Comme la fréquence d'acquisition de la caméra est inférieure à la fréquence des battements cardiaques, le pic correspondant ne sera pas visible sur le spectre. De plus, le spectre de Fourier est calculé en moyennant les densités spectrales de puissance sur une région particulière de la moelle afin de limiter le bruit de la caméra. Enfin, comme la durée de l'acquisition est grande en comparaison de la fréquence d'acquisition, la largeur de la gaussienne est suffisamment petite pour ne pas avoir besoin de la prendre en compte. Ainsi, le spectre de Fourier représente :

$$TF_S(\nu) = TF_{hrf}(\nu) \times \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \delta\left(\nu - \frac{n}{T_s}\right) + b_r \times \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \delta\left(\nu - \frac{n}{T_r}\right)$$

Ainsi, le signal sera principalement constitué de la transformée de Fourier de la réponse hémodynamique échantillonnée à la fréquence de stimulation et de celle de la respiration échantillonnée à la fréquence de la respiration.

4.3.3 Images de phase et d'amplitude

Dans le domaine de Fourier, la phase est reliée à l'information temporelle puisque plus la phase en un point est faible, plus le phénomène en ce point intervient en avance. Ainsi, si un événement se produit t_0 avant t , la transformée de Fourier devient :

$$TF(I_{x,y})_{t-t_0} = TF(I_{x,y})_t \times e^{-i2\pi t_0 f} = |TF(I_{x,y})_t| \times e^{i(\phi(TF(I_{x,y})_t) - 2\pi t_0 f)} \quad (4.26)$$

et la phase est diminuée de $2\pi t_0$. L'amplitude renseigne sur l'appartenance d'un point à la zone d'activation : si l'amplitude à la fréquence de stimulation en un point est significativement différente de zéro, cela signifie que la valeur de l'intensité réfléchie en ce point est modifiée de manière synchrone avec la stimulation. En outre, plus la variation

est élevée, plus l'amplitude sera importante.

Les images de phase et d'amplitude sont alors déterminées pour la fréquence de stimulation. En combinant les deux images, comme nous l'avons déjà expliqué pour les cartes de corrélation croisée, cette technique permet de déterminer les zones d'activation ainsi que les occurrences temporelles de l'activation en chaque point.

Résumé : Nous disposons ainsi de plusieurs méthodes d'analyse qui peuvent s'appliquer aussi bien aux données d'imagerie optique que d'imagerie par speckle, et permettent soit de faire ressortir le signal recherché par rapport au bruit, soit d'identifier les caractéristiques spatiales et temporelles des variations. Les résultats de ces techniques seront énoncés dans la prochaine partie. Elle décrira également dans un premier temps les tests qui nous ont permis de valider le fonctionnement de notre système.

CHAPITRE 5

VALIDATION DU SYSTÈME ET RÉSULTATS INITIAUX

Le système et les procédures d'analyse de données décrits précédemment ont été entièrement conçues dans le cadre de ce travail. Avant de lancer des mesures *in vivo*, il importait de valider son bon fonctionnement et la validité de l'approche d'analyse proposée à la fois en imagerie optique et en imagerie par speckle. Ce chapitre présente les tests effectués.

5.1 Validation du système

5.1.1 Test du système d'imagerie optique

Nous avons testé la capacité du système d'imagerie optique à enregistrer des variations d'intensité de très faible amplitude. Cette étape de validation, déjà utilisée et décrite dans Grinvald et al. (1999), est nécessaire avant d'entamer les expériences animales. Les variations en intensité seront produites par l'illumination d'une diode (1) dont la puissance est réglée de telle manière que le maximum de la plage dynamique de la caméra soit utilisé lorsqu'elle est directement observée. Un atténuateur optique (1/100) est placé devant cette diode (1), puis l'ensemble est éclairé par la diode (2) que nous souhaitons tester, à nouveau de telle manière que l'ensemble de la plage de la caméra soit utilisé. Ainsi, dans le cas où la diode (1) située sous l'atténuateur est allumée, nous enregistrons une différence d'intensité de 0.01 par rapport au cas où elle est éteinte. Cette différence correspond à l'ordre de grandeur des signaux que nous nous attendons à imager. La figure 5.1 montre les résultats obtenus. Même si le simple affichage des variations rela-

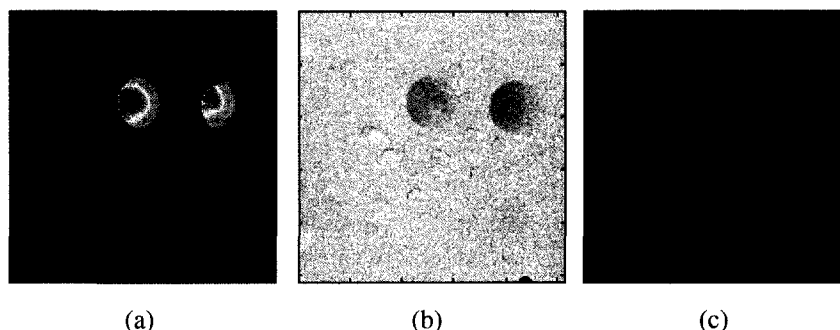


FIG. 5.1 Test du système d'imagerie optique. (a) Images de la diode sans atténuateur optique. (b) Carte des variations enregistrées. (c) Résultat obtenu après traitement morphologique.

tives ne permet pas de retrouver exactement la position de diodes, un simple seuillage suivi d'une opération d'ouverture inverse morphologique, qui permet de sélectionner les régions dont les pixels sont écartés d'un espace inférieur à la taille de l'élément structurant, y suffit.

Cette validation du système ne permet cependant pas de tenir compte des bruits physiologiques qui, de part les observations faites au fur et à mesure des expériences, sont les principaux facteurs limitant ce type d'imagerie. Seule une étude animale validera définitivement l'utilisation de notre système.

5.1.2 Test du système d'imagerie par analyse du speckle

Le principe de l'imagerie par speckle a été validé par trois expériences : une expérience *in vitro* et deux expériences *in vivo*.

Validation in vitro : Nous faisons circuler un mélange de sang et de produit anticoagulant dans un catheter de diamètre interne égal à 0.58 mm. La vitesse est générée par un pousse seringue électrique. Nous avons effectué deux acquisitions, la première pour une vitesse nulle et la seconde pour une vitesse de 1 mm.s^{-1} , afin de vérifier que l'imagerie par speckle permet de distinguer ces deux états. Nous pouvons déjà remarquer

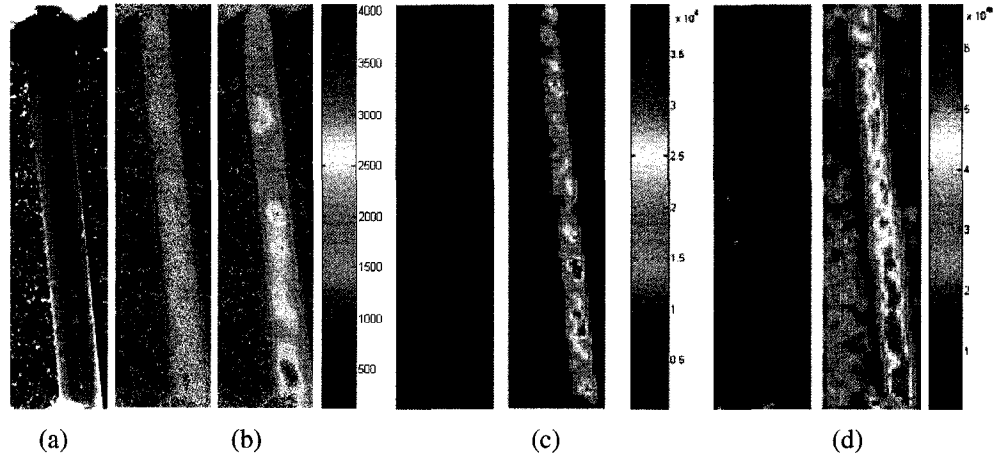


FIG. 5.2 (a) Photo du catheter sous lumière blanche. (b) Images brutes de speckle pour un flot nul ou égal à 1 mm.s^{-1} . (b) et (c) Cartes des vitesses correspondantes obtenues à partir du calcul du contraste spatial (c) ou du contraste temporel (d).

sur les images brutes que le flou est moins important dans le tuyau lorsque le flot est nul (Figure 5.2(b)). Cette observation est confirmée par la détermination des cartes des vitesses, calculées à partir du contraste spatial (Figure 5.2(c)) et du contraste temporel (Figure 5.2(d)), puis affichées dans les deux situations avec la même échelle de couleur. L'augmentation de vitesse dans le tuyau est clairement identifiée, ce qui permet de valider cette première étape. L'inverse du temps de corrélation dans le tuyau, évalué approximativement à $5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, permet de déterminer une valeur de la constante a caractéristique à partir de la longueur d'onde du laser utilisé (780 nm) et de la vitesse moyenne supposée des particules (1 mm.s^{-1}). Elle est du même ordre de grandeur que celle donnée dans Richards and Briers (1997).

$$\begin{aligned}
 a &= \frac{1}{\tau_c \nu k_0} \\
 a &= \frac{5.10^4 \times 780.10^{-9}}{10^{-3} \times 2\pi} \\
 a &= 6.2
 \end{aligned}$$

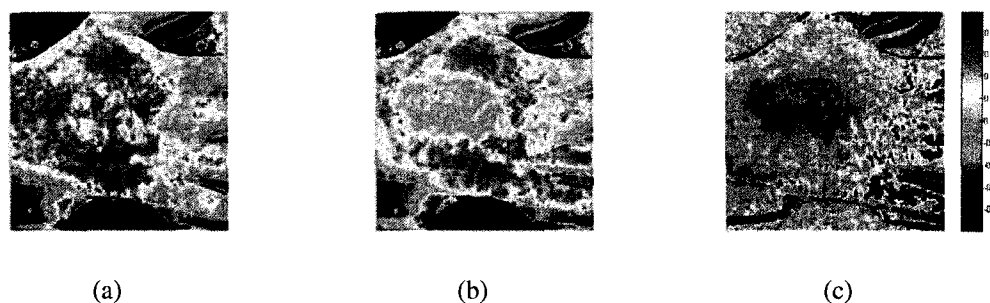


FIG. 5.3 Images de contraste spatial (5x5) avant (a) et après (b) grattage du dos de la main. (c) Carte des variations relatives.

Validation in vivo : Son principe s'inspire de l'article de Briers (2007) et vise à vérifier la possibilité de mesurer les variations de la vitesse sanguine au sein de la microvasculature subcutanée. Son principe est simple : gratter le dos de la main crée une inflammation locale, donc une augmentation du débit sanguin que nous souhaitons localiser. En présentant à la figure 5.3 les cartes de contraste spatial moyennées et obtenues à partir de deux séries de cinq images prises respectivement avant (a) et après (b) le grattage, permettent d'identifier la zone dans laquelle le contraste a diminué et la vitesse sanguine a augmenté. Cette expérience nous a donc permis de valider l'utilisation *in vivo* de l'imagerie par speckle pour déterminer un changement local de la vélocité sanguine. On peut également souligner le fait que ces changements sont intervenus sous la surface de la peau et qu'ils peuvent par conséquent être détectés malgré l'atténuation relative à la propagation dans les tissus.

Segmentation des vaisseaux : La moelle épinière a été éclairée par le laser, puis une série d'images a été acquise par la caméra CCD. La figure 5.4 présente la carte de contraste spatial et la carte des vitesses calculées à partir de l'une de ces images, et permet de distinguer clairement la veine centrale dans laquelle la vitesse sanguine est la plus élevée. De plus, la figure 5.5(a) met en évidence la précision atteinte par les cartes de contraste temporel construites à partir de dix images brutes. On note sur les figures 5.5(b) et 5.5(c) l'importance d'utiliser un échantillonnage non linéaire du temps

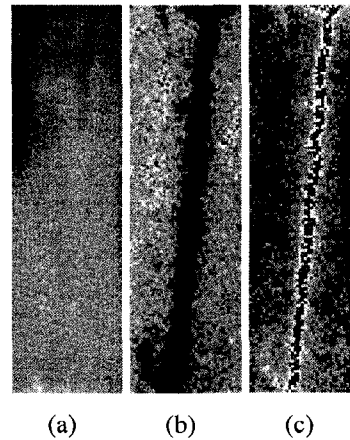


FIG. 5.4 (a) Image de speckle résultante de l'illumination de la moelle par un laser. (b) Image de contraste spatial calculée pour une fenêtre de 5×5 pixels. (c) Image de vitesses construite par inversion de la relation entre le contraste et la vitesse selon l'équation (2.14).

de corrélation du speckle pour calculer les cartes de vitesses afin de conserver une bonne résolution des vitesses élevées. La figure 5.5(d) montre que la segmentation de la veine centrale spinale, obtenue par seuillage de la vitesse, concorde presque parfaitement avec l'anatomie de la moelle.

5.2 Etude préliminaire

Le but de cette étude préliminaire est d'explorer l'espace des paramètres de stimulation et de détection afin de déterminer les paramètres optimaux pour les études subséquentes. L'approche initialement adoptée est donc moins structurée. Les paramètres d'acquisition ont été modifiés au fur et à mesure des expériences afin d'explorer l'ensemble des paramètres.

Un total de douze expériences a été initialement mené entre août et décembre 2007. Les expériences pendant lesquelles le rat est mort prématurément n'ont pas été prises en compte. Le tableau présenté en annexe I résume ces expériences. Sur les douze

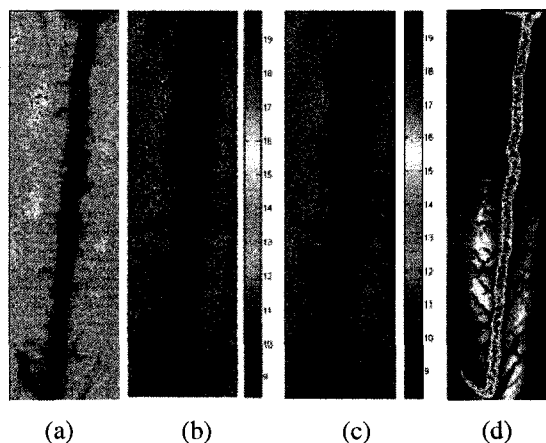


FIG. 5.5 (a) Image de contraste temporel construite à partir de dix images brutes. (b) Image de vitesse calculée avec un échantillonnage linéaire du contraste lors de l'inversion de l'équation (2.14). (c) Même image calculée avec un échantillonnage logarithmique. (d) Résultat de la segmentation superposé à l'image anatomique de la moelle épinière.

rats utilisés, cinq l'ont été pour le nerf tibial, trois pour le nerf péronéal, trois pour le nerf médian, six pour le nerf sciatique et cinq pour les voies descendantes de la moelle épinière. Un rat a pu servir à l'étude de plusieurs stimulations. Les deux protocoles (bloc et continu) ainsi que les deux analyses associées ont été utilisés. En présentant certains des résultats obtenus, nous montrerons tout d'abord la possibilité d'imager la réponse hémodynamique dans la moelle. Ensuite, en analysant l'ensemble des expériences réalisées, nous établirons les paramètres à utiliser afin de garantir le meilleur "rendement" des résultats.

5.2.1 Exemple de résultats

5.2.1.1 Stimulation par blocs

L'exemple présenté dans ce paragraphe est issu de l'expérience R7E3, pour laquelle nous avons appliqué une stimulation par blocs de 0.09 mA. Le rat est anesthésié grâce

au mélange Kétamine/Xylazine. Le décours temporel des variations relatives d'intensité illustré à la figure 5.7 montre que la variation maximale est de 10^{-6} , ce qui confirme la faible amplitude des changements d'intensité. L'allure générale de l'évolution de la réflectance correspond à l'évolution attendue de la concentration en déoxyhemoglobine (HbR), notamment le deuxième pic à cinq secondes qui est relié au flush sanguin dont l'origine physiologique a été décrite à la partie 1.1.1.2. Le premier pic négatif est cependant plus problématique et correspond davantage à un artéfact relié à la stimulation électrique qu'à une diminution réelle de la concentration associée à l'*initial dip*.

Identification du flush sanguin Le flush sanguin entraîne la diminution de la concentration en HbR et par conséquent l'augmentation de la réflectance définie par $\frac{I-I_0}{I_0}$. L'affichage des évolutions spatio-temporelles des variations à la figure 5.8 permet tout d'abord de vérifier la propriété d'ipsilatéralité de l'activation neuronale, puis de remarquer que les variations de concentration sont maximales au niveau des veines latérales situées à proximité de la zone d'activation, et au niveau de la veine centrale. Cela s'explique par le fait que les veines drainent le sang depuis la zone activée et intègrent donc les variations de l'ensemble de la zone. En conséquence, même si la veine centrale ne reflète pas directement la réponse hémodynamique, on peut supposer que l'étude de son décours temporel (Figure 5.6) permet également de quantifier la réponse. Ce décours est néanmoins déformé par rapport à celui évalué dans la ROI. La comparaison du spectre de Fourier du décours dans la veine avec celui dans la ROI montre que la réponse veinale est plus sensible à la respiration, caractérisée par une fréquence de 1.33 Hz (correspondant à un rythme respiratoire de 80 battements par minute) et dont la deuxième composante est visible à 2.66 Hz. Le pic de la réponse veinale arrive à 7 s, contre 5 s pour la réponse dans la ROI. Ce retard de 2 s entre les deux variations maximales peut être interprété comme le temps de propagation du changement de concentration sanguine entre la zone d'activation et la veine. La carte de corrélation croisée illustre ces différences pour l'ensemble de l'image (Figure 5.9(a)). Les changements de concentrations affectent tout

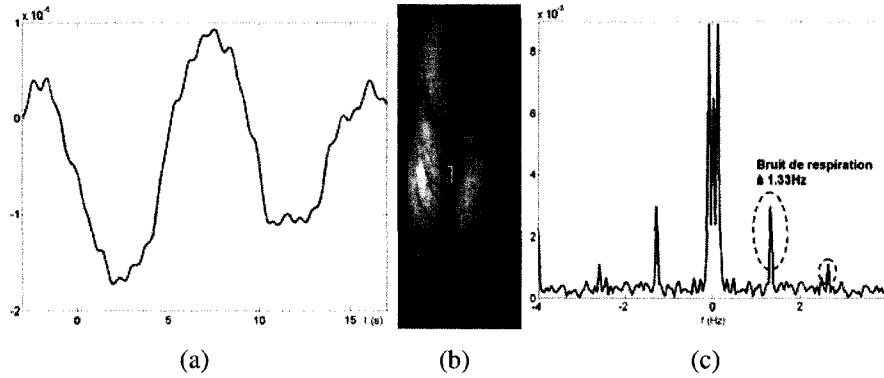


FIG. 5.6 Décours temporel filtré de la réflectance $\frac{I-I_0}{I_0}$ (a) moyennée sur une zone sélectionnée dans la veine centrale (b). (c) représente la FFT de ces variations.

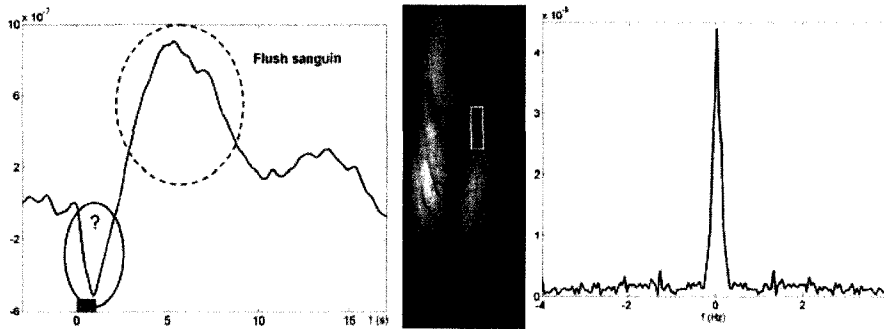


FIG. 5.7 Décours temporel filtré de la réflectance $\frac{I-I_0}{I_0}$ (a) moyennée sur une zone latérale (b) de la moelle correspondant à une activation. (c) représente la FFT de la réponse hémodynamique estimée.

d'abord la région activée colorée en rose, puis les veines latérales en bleu, puis gagnent progressivement la veine spinale centrale avant d'être expulsés environ quatre secondes après le début de l'activation. Cette distribution temporelle, pondérée par la force de la réponse, permet donc d'identifier la zone d'activation en rose et en bleu. La localisation de la région est de plus confirmée par le calcul de la carte de corrélation (Figure 5.9(b)) déterminée à partir du décours temporel présenté à la figure 5.7.

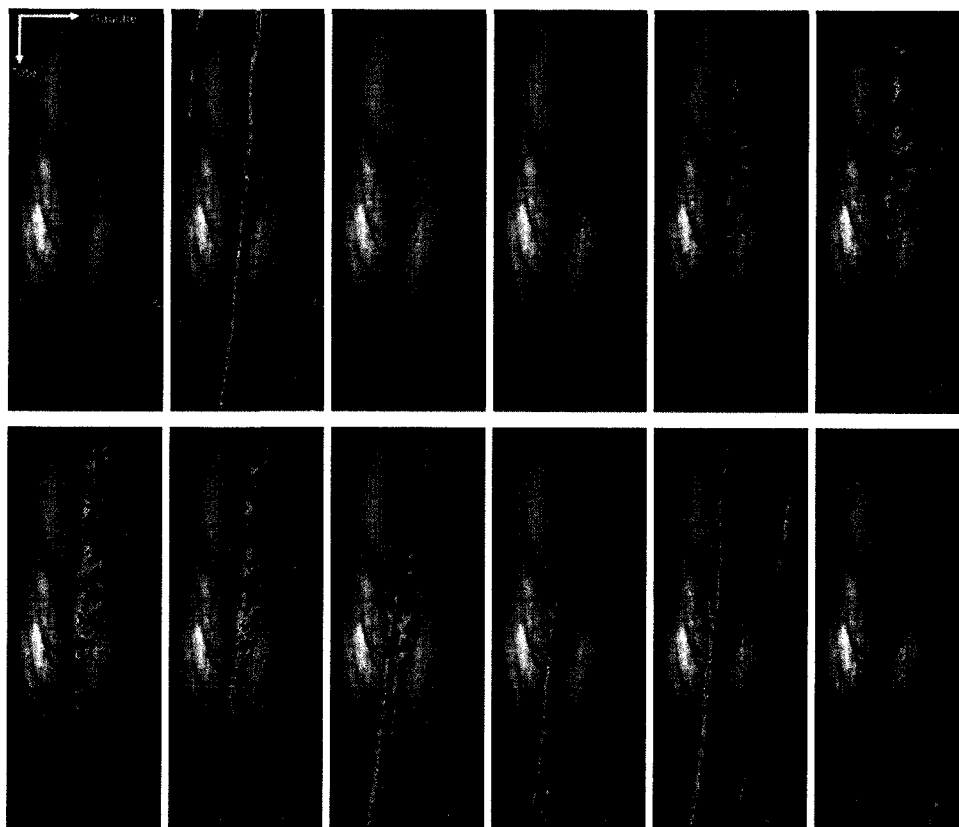


FIG. 5.8 Evolution spatio-temporelle de la réflectance $\frac{I-I_0}{I_0}$ pour des valeurs supérieures à 10^6 et pour un temps post stimulus compris entre 0 et 14 s.

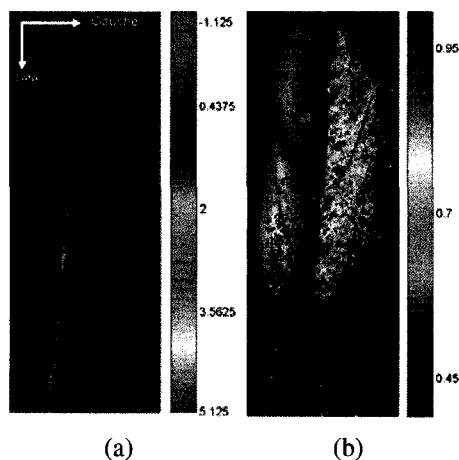


FIG. 5.9 (a) Carte de corrélation croisée dont la couleur code l'échelle temporelle, et l'intensité le maximum de la corrélation croisée entre le décours de la figure 5.7 et le décours temporel en chaque point. (b) Carte des coefficients de corrélation simple entre ce même décours et le décours temporel en chaque point.

Artéfact de stimulation ou *initial dip* ? Ce point est essentiel puisque ces deux événements interviennent dans la même fenêtre temporelle.

Le premier indice sur lequel nous pouvons nous baser pour répondre à cette question est la localisation spatiale de la diminution de la réflectance. Alors que l'*initial dip* est spatialement limité à une région correspondant à la zone d'activation identifiée grâce au flush sanguin, l'artéfact de stimulation affecte l'ensemble de la moelle. Il est néanmoins principalement visible sur la veine centrale étant donné la différence de contraste avec la surface blanche. La figure 5.10(c) illustre les zones dont les variations par rapport au baseline entre 0 et 1 s sont les plus importantes, et montre que le pic enregistré entre 0 et 1 s est dû à un artefact de stimulation plutôt qu'à la présence d'un *initial dip*. Le second indice est le temps d'arrivée de l'*initial dip*, puisque si le maximum des variations arrive après la première seconde, il ne peut pas s'agir d'un artéfact. L'analyse du décours filtré ne permet pas de distinguer la réponse hémodynamique de l'artéfact de stimulation (Figure 5.10(a)). En effet, malgré son efficacité à supprimer presque totalement le bruit physiologique, il est inefficace dans ce cas puisqu'il s'agit d'un événement ponctuel et non périodique. Cependant, les techniques d'isolation de sources, décrites

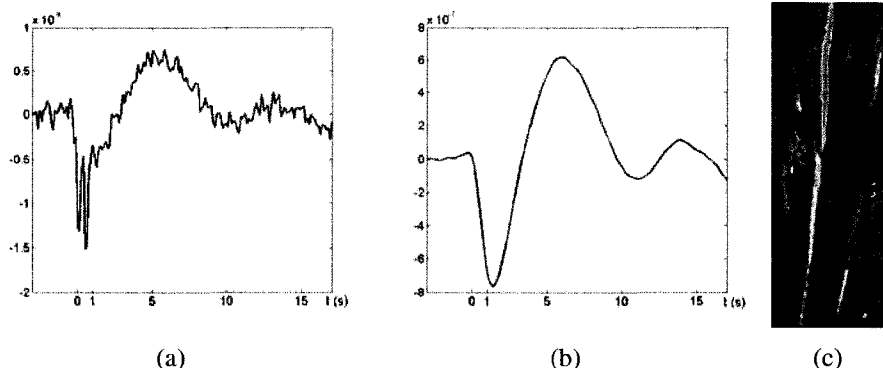


FIG. 5.10 (a) Décours brut des variations de réflectance dans la ROI. (b) Même décours après filtrage de Chebishev. (c) Localisation spatiale du pic initial. Les variations inférieures à -4.10^{-7} sont affichées en superposition de l'image anatomique.

au paragraphe 4.2.2.2, permettent d'isoler l'artéfact plus efficacement. La figure 5.11 expose les résultats obtenus par l'analyse en composantes indépendantes à partir des points sélectionnés dans la même ROI que précédemment. La première composante correspond à l'artéfact de stimulation que nous souhaitons supprimer (Figure 5.11(a)). Le nouveau décours temporel sur la région d'intérêt (Figure 5.11(c)) est calculé en appliquant l'équation (4.23). L'artéfact a été supprimé mais, en comparant plus attentivement le résultat obtenu avec le décours temporel initial, on remarque que l'amplitude du pic correspondant au flush sanguin est diminué d'environ 2×10^{-7} , mais aussi que la composante de l'artéfact n'est pas strictement nulle au delà de la première seconde. Par conséquent, cette analyse n'a pas permis d'isoler complètement les variations dues à la réponse hémodynamique de celles relatives à l'artéfact de stimulation. Ainsi, il faut porter attention lors de l'expérience à l'état de paralysie de l'animal afin d'éviter la présence de ces artéfacts, que même des techniques plus poussées de débruitage par estimation de sources n'ont pas permis de supprimer totalement.

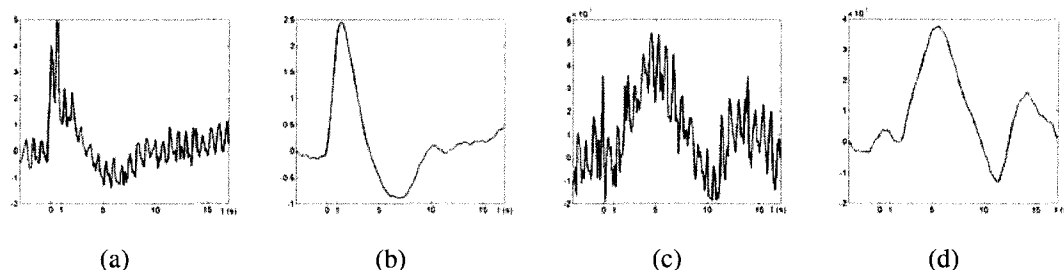


FIG. 5.11 (a) et (b) Première composante initiale déterminée par ICP. (c) et (d) Résultat de la suppression de cette composante sur le décours temporel dans la ROI.

5.2.1.2 Stimulation continue

Sur le même animal, nous avons utilisé le protocole de stimulation continue décrit au paragraphe 3.4. Le spectre estimé sur la même ROI que précédemment est illustré à la figure 5.12 et permet d'identifier clairement le pic correspondant à la fréquence de stimulation $f = \frac{1}{6.4} = 0.1560$ Hz mais aussi cinq autres harmoniques (0.3120, 0.4680, 0.6240, 0.7814, et 0.9374 Hz) qui correspondent à la multiplication de la transformée de la réponse hémodynamique par le peigne de Dirac comme nous l'avons expliqué à la partie 4.3.2. Retrouver la réponse hémodynamique par cette méthode est limité à la fois par le niveau de bruit qui empêche de détecter davantage d'harmoniques du signal, et par la trop faible fréquence de stimulation qui impose un échantillonnage insuffisant de la transformée de Fourier. Cette dernière ne peut cependant pas être augmentée puisqu'elle est contrainte par le temps nécessaire à la réponse hémodynamique pour revenir à son état de repos après chaque stimulation. On retrouve également sur le spectre le pic de respiration à $f = 1.30$ Hz. Nous avons calculé les images de phase et d'amplitude à la fréquence de stimulation. Ces cartes sont illustrées à la figure 5.13. La précision de la carte des phases est supérieure à celle des amplitudes et permet de distinguer clairement la veine spinale centrale et la région activée. L'image des phases permet ainsi d'isoler la surface d'activation en sélectionnant les zones dont le retard temporel est compris entre 0 et 2.3 s (Fig 5.13(c)). La veine centrale affiche quant à elle un retard compris entre 4

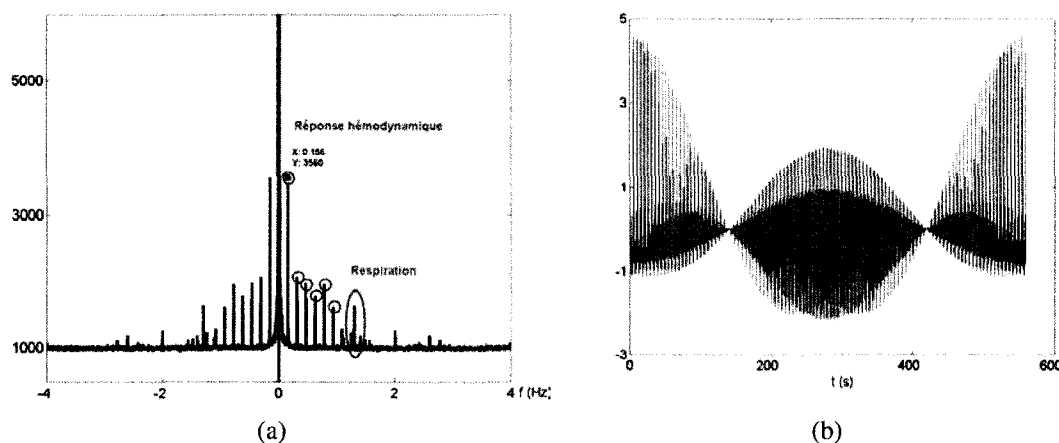


FIG. 5.12 (a) Amplitude du spectre de Fourier estimé. Les cercles en rouge sont les pics correspondant au harmoniques de la réponse hémodynamique. (b) Transformée de Fourier inverse calculée à partir des pics sélectionnés précédemment.

et 5 s.

5.2.2 Comparaison des deux techniques

Les deux techniques (en blocs et en continue) ont donc permis de mettre en évidence la possibilité d'enregistrer la réponse hémodynamique dans la moelle épinière. La stimulation par blocs permet d'afficher les variations spatiotemporelles, d'estimer la réponse hémodynamique, de caractériser la zone d'activation, mais aussi de déterminer la propagation des variations de concentration au sein de l'image. Nous pouvons comparer les surfaces d'activation obtenues par stimulation continue (Figure 5.13(c)) et par stimulation par blocs (Figure 5.9(b)) et constater que même si les zones ne se correspondent pas tout à fait, elles désignent essentiellement la partie gauche de la moelle, principalement vers la queue de l'animal. En outre, la propagation des variations de concentration calculée par l'analyse de la phase en stimulation continue concorde avec celle déterminée par la corrélation croisée en stimulation par blocs. En effet, les deux techniques permettent de mettre en évidence l'expulsion du sang par la veine spinale supérieure avec

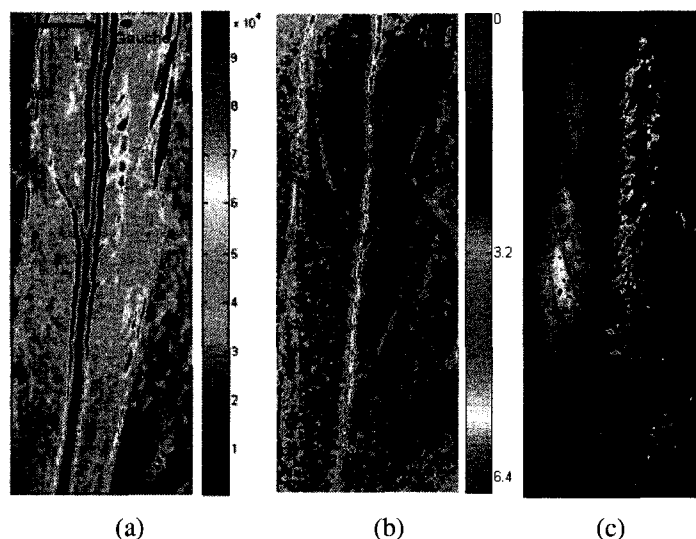


FIG. 5.13 Images représentant en chaque point l'amplitude (a) et la phase convertie en secondes (b) de la transformée de Fourier prise à la fréquence de stimulation (0.1562 Hz). (c) Segmentation et identification de la zone d'activation par sélection de la phase ($0 < t < 2.30$).

des temps relatifs à l'activation comparables et de l'ordre de trois secondes.

Par contre, la stimulation continue, même si elle repose sur une analyse plus originale et que des résultats cohérents avec la stimulation par blocs ont été obtenus, ne permet pas d'obtenir le décours temporel de l'activation et a donc un intérêt plus limité. Nous n'avons pas réussi à estimer le temps post stimulus pour lequel l'activation est maximale en utilisant cette méthode. C'est pourquoi nous avons privilégié dans la suite du travail l'analyse classique de la stimulation par blocs.

5.2.3 Conclusions de l'étude préliminaire

Dans le paragraphe précédent, nous avons démontré sur un exemple précis la possibilité de déterminer par imagerie optique les caractéristiques spatiales et temporelles de la réponse hémodynamique dans la moelle. Plusieurs expériences ont été menées et leurs paramètres d'acquisition sont présentés en annexe I. L'instabilité des résultats obtenus

nous a poussés à limiter l'ensemble des paramètres pouvant rentrer en jeu et à choisir des protocoles chirurgical et expérimental plus systématiques, ainsi qu'à améliorer le système d'acquisition.

Chirurgie : Les changements chirurgicaux apportés concernent principalement le retrait de la dure mère et le choix de l'anesthésique. La dure mère est une couche de protection recouvrant l'ensemble du système nerveux central et donc la moelle épinière. Lors de la première phase de l'étude, elle était systématiquement enlevée afin de limiter la diffraction lumineuse et d'augmenter la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus. Cependant, enlever la couche protectrice ne permet pas de nettoyer la moelle dans le cas où du sang, issu des muscles latéraux, se répand sur la surface. De telles situations nous ont conduits à laisser la dure mère intacte pendant les expériences. Concernant le choix de l'anesthésiant, comme nous l'avons déjà souligné à la partie 3.5, le produit utilisé joue un rôle important dans l'amplitude de l'activation. Nous avons donc décidé de changer d'anesthésiant et d'opter pour l'alphachloralose. En outre, comme nous l'avons vu au paragraphe 5.2.1.1, il est essentiel de s'assurer de la paralysie de l'animal au moment de la stimulation, afin de ne pas perdre l'information portant sur l'*initial dip*.

Stimulation : La première conclusion à la lecture du tableau récapitulatif présenté à l'annexe I est que seule la stimulation des nerfs sciatiques a permis d'obtenir des résultats de manière suffisamment régulière. Pour une expérience, nous avons également détecté une activation après l'excitation des voies descendantes, mais cette dernière n'était pas localisée. Nous avons donc décidé de **limiter l'étude au nerf sciatique**. Nous avons de plus opté pour une intensité de stimulation supérieure à 0.03 mA, ce qui correspond au threshold musculaire pour une stimulation de 1 ms et à quatre fois le threshold musculaire pour une stimulation de 10 ms. Les intensités fixées pour l'étude sont de 0.03, 0.045, 0.06 et 0.09 mA.

Modifications générales : Le programme d'acquisition sous Labview a été modifié pour

augmenter la fréquence d'acquisition des images et pour permettre l'utilisation de plusieurs longueurs d'onde d'éclairage. Alors que la fréquence maximale précédente était de 8 Hz, elle atteint maintenant 15 Hz, et permet d'utiliser jusqu'à trois longueurs d'onde différentes. De plus, la longueur d'onde principalement utilisée pour les expériences a été également modifiée. Alors que nous utilisions une diode orange à 609 nm, nous avons opté pour une diode plus puissante et moins focalisée afin d'obtenir un éclairage plus uniforme de la surface de la moelle. Cette diode a une longueur d'onde d'émission de 637 nm. Le nouveau rapport entre les coefficients d'extinction de HbR et de HbO est de l'ordre de 9 contre 6 auparavant. Les deux autres diodes éclairent dans le vert à 540 nm et dans le jaune à 587 nm. Nous avons également choisi des fixations plus rigides de la caméra et de la lumière afin de limiter les vibrations.

Une fois ces modifications apportées et l'ensemble des paramètres expérimentaux fixés, une série d'expériences plus rigoureuses a été réalisée. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article, déposé en soumission en mai 2008 à NeuroImage (Elsevier) et présenté dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 6

ARTICLE 1 : CHARACTERIZATION OF THE HEMODYNAMIC AND METABOLIC RESPONSE IN THE IN VIVO RAT LUMBAR SPINAL CORD BY INTRINSIC IMAGING

Ce chapitre est constitué par l'article portant le même nom, soumis à NeuroImage en mai 2008, et dont les co-auteurs sont Eric Beaumont, Simon Dubeau et Frédéric Lesage. Ce document présente les résultats obtenus lors d'une étude de groupe menée sur la détermination de la réponse hémodynamique dans la moelle épinière. Après avoir rappelé les principes de l'imagerie optique et speckle et avoir détaillé les méthodes de stimulation et d'analyse, l'article expose nos principaux résultats, obtenus à partir de l'analyse des données fournies en Annexe II. Il aboutit au calcul de la relation de dépendance entre la réponse et la force de la stimulation, à la détermination de l'évolution temporelle moyennée de l'activation en fonction de l'intensité, et à une estimation des concentrations en HbO, HbR et HbT ainsi qu'à celle de la consommation métabolique associée à la réponse neuronale (CMRO₂).

6.1 Abstract

Intrinsic Optical Imaging (IOI) is a useful tool to record signals originating from the entire lumbar spinal cord in small animals. The present study aims to characterize the hemodynamics of the spinal cord following neuronal activation in the anaesthetized rat and to study the reproducibility and spatial accuracy of IOI imaging. Single wavelength optical intrinsic imaging was performed on nine rats using different stimulation intensities with an event related protocol. Results show reproducible responses, localized in L3-L5, following electrical stimulation of the sciatic nerve. The vascular behavior of the response as well as an estimate of the relation between the stimulation intensity and the hemodynamic response is described. Finally, we show that the Cerebral Metabolic Rate of O_2 (CMRO₂) can be estimated with the addition of multi-spectral information and a measure of blood flow.

6.2 Introduction

Compared to the brain, the metabolic and vascular behavior of the spinal cord has not been extensively studied with imaging techniques. The small size of the cord, physiological motions and susceptibility artifacts have hampered fMRI studies and clear and consistent results have only recently emerged (Stroman and Ryner, 2001; Stroman et al., 2005; Maieron et al., 2007). However, detection is still a challenge even in the presence of strong stimuli (Malisza et al., 2003; Zhao et al., 2007; Givers et al., 2007; Brooks et al., 2008). Although electrophysiology can provide partial information on the underlying neuronal activity, it cannot resolve large neuronal populations and measure changes that may occur after injury. Approximately 12 000 spinal cord trauma happen each year in North America (System, 2008) and the emergence of new neuronal recording techniques is crucial in understanding the post traumatic neuronal reorganization of

the spinal cord. This however can not be done without a characterization of the response and its reproducibility in normal subjects. Intrinsic Optical Imaging (IOI) has been used to record spinal cord responses following nerve stimulation in rats but only the initial dip of the response was measured (Sasaki et al., 2002, 2003). This makes the comparison with fMRI difficult since the latter method rather relies on the local increase of incoming blood flow and blood volume. Our aim is to extend this previous work with small animals to spatially and temporally characterize the hemodynamic and blood flow responses in a group study and to assess their reproducibility. We also aim to characterize the effect of large vasculature on the response given its overwhelming presence in the cord. Although IOI is invasive compared to fMRI, the increased spatial and temporal accuracy provides useful information in terms of hemodynamic response location and peaking time. Moreover, we hope that characterizing the hemodynamic response for a group of normal anaesthetized rats will trigger studies of neuronal reorganization following spinal cord injury using hemodynamic-based techniques.

Neuronal activation is linked to a vascular-metabolic reaction called the hemodynamic response consisting of an increase of both blood volume (BV) and blood flow (BF) several seconds after stimulation. It is notably regulated by the arterioles dilatation following the release of vasodilator substances (Girouard and Iadecola, 2006). Optical imaging can provide information on both BV and BF and thereby indirectly generate precise maps of the underlying neuronal activation. For example, variations of BF have been measured by Laser Doppler Imaging and by Laser Speckle Imaging (Durduran et al., 2004; Dunn et al., 2001; Li et al., 2006). The rise of BV due to incoming oxygenated blood flow and its associated increase of oxyhemoglobin (HbO) concentration and decrease of deoxyhemoglobin (HbR) can be imaged by IOI (Malonek and Grinvald, 1996; Luo et al., 2007; Sheth et al., 2003). Hemoglobin components can be separated with multi wavelength systems (Dunn et al., 2005; Sheth et al., 2004). CMRO₂ can also be inferred from the mentioned measurements providing a more direct measure of neuronal

activation.

The ability of IOI to image the spinal cord of the rat consecutive to median, ulnar and radial nerves stimulation was demonstrated in Sasaki et al. (2002, 2003). However, this work was focused on the cervical activation and presented hemodynamic variations in only the first few seconds following stimulation. fMRI imaging of the lumbar area of the rat spinal cord consecutive to a sciatic stimulation has been performed in (Malisza et al., 2003; Lawrence et al., 2004; Zhao et al., 2007). The two last studies aimed at evaluating the relationship between fMRI signal and neural activation, and at studying noxious versus non noxious neural reactions. Poor spatial resolution was found and the temporal characteristic of the response was not explored. The cervical region was also studied by Malisza and Stroman (2002) and Lawrence and Stroman (2007). Some results were also obtained in the lumbar region of the cat spinal cord in Zhao et al. (2006). However, the full characterization of the hemodynamic response, in particular the simultaneous BV, BF and associated $CMRO_2$ responses to stimulation have not been imaged before, to our knowledge. This is a valuable task since the hemodynamic behavior in the spinal cord is thought to be different from the cortex. In particular Nix et al. (1976) compared the microflow recovery time in both the cortex and the spinal cord after nerve stimulation or a hypercapnic challenge and concluded that responses in the spinal cord and in the brain have different peaking time. fMRI detection techniques are based on a "canonical" response to stimuli. Thus providing the right hemodynamic response will certainly increase sensitivity.

Both motoneurons and interneurons are stimulated by direct nerve stimulation. The interneurons account for 97% of the total neurons of the spinal cord (Willis and Coggeshall, 1991) and are located closer to the surface in the spinal cord (600 μm for the rat). Although there is no direct relationship between this number and the hemodynamic response, previous work on the spinal cord (Sasaki et al., 2002) show that the optical signal disappears when a synaptic blocker is applied indicating that this technique is more

sensitive to interneurons.

The purpose of this study is first to quantify and to assess the variability of the spinal cord hemodynamic response in a group study. The presence of large veins and prominent vasculature leads us to focus on the temporal variations of the response to better identify the localization of capillary responses. Also we use the simultaneous measure of BF and BV to estimate the metabolic CMRO₂ consumption from the HbO, HbR and BF evolutions. This is less prone to vascular effects.

6.3 Material and methods

6.3.1 Surgical procedure

All procedures were conducted according to the recommendations of the Canadian Council for Animal Care, and were approved by the animal ethics committee of the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal. A total of n=9 female Sprague Dawley rats of 240 to 300g weight were anaesthetized with isoflurane (5%) and rectal temperature was monitored and maintained at 37 degree celcius with a heating blanket (Harvard). The sciatic nerve was isolated either in the left or in the right lower limb and a bipolar stainless electrode was attached to the tibial nerve. The rats were artificially ventilated (Kent Scientific, CT) via a tracheostomy using ambient air with a supplement of pure oxygen. Breathing rate was maintained near 78 cycles/min using a 2ml tidal volume and was set to obtain an end tidal CO₂ concentration of (3±0.39%). Both heart rate (Nihon Kohder) and CO₂ level (Capstar 100) were monitored. The rats were then positioned on a custom made stereotaxic frame and a laminectomy was performed to expose lumbar spinal cord segments from Thoracic 10 (T10) to Sacral 1 (S1). The muscular excitation threshold of the sciatic nerve was measured with a 10ms pulse. After surgery, isoflurane administration was decreased to 2-3 percent and the animals were paralyzed with pancuronium (4mg/kg/h) and

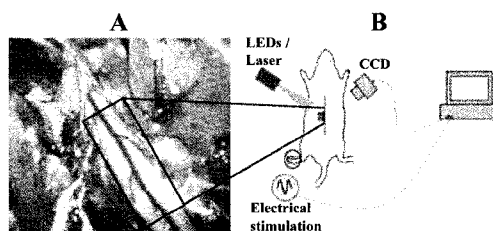


FIG. 6.1 (A) Photography of the surgical exposure of the cord.(B) Experimental setup for the optical intrinsic imaging of the spinal cord during electrical sciatic stimulation.

anaesthetized with alpha-chloralose (first a bolus of 50mg/kg, then 25mg/kg/h). Then, 30 minutes was allowed for the animal to stabilize. Mineral oil was added to prevent drying of the spinal cord and two clamps were used to cancel any movement. The first one was set on the spinous process at T11 to prevent any longitudinal spinal cord movement induced by breathing. Another set of clamps was used to secure the spinous process at S1. The surrounding area of the spinal cord was covered with Gelfoam (Pharmacia&Upjohn) to prevent bleeding.

6.3.2 Material

The imaging setup is illustrated in Fig. 6.1. The images were acquired with a 12 bits CCD camera (CS3960DCL, Toshiba Teli) having a 1392×1040 resolution and a pixel size of $6.45 \mu m$. A Labview interface (National Instrument) was used to control the camera, record images, synchronize the acquisition and the electrical stimulation, and to change the illumination. A Nikkor Macro lens ($f = 50mm$) was used to get a sufficiently small focal depth ($\approx 150 \mu m$). At the beginning of the experiment, the focus was done on the surface of the spinal cord using green light to get an anatomical image. The optical system was then moved down to $600 \mu m$. Functional images of the unfocused spinal cord were recorded with a single (637nm) or a multiple flashing illumination (525, 590, 637nm) produced by high power LEDs (Optek Technologies). The illumination was set so that no part of the spinal cord was under or over saturated for any of the wavelengths.

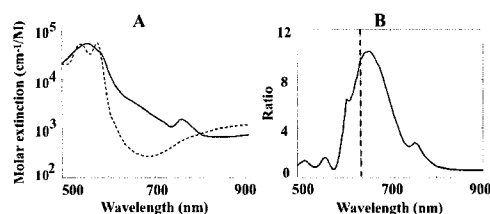


FIG. 6.2 (A) Spectral evolution of the HbR and the HbO extinction coefficients, in mol.L^{-1} , between 450nm and 950nm. (B) Evolution of their ratio. The dotted line indicates its value for the wavelength used for the functional imaging.

For laser speckle imaging, a red 780nm laser was positioned and the camera aperture was set to 5.6 so that the pixel size matched the speckle size (Briers, 2001; Richards and Briers, 1997). As the aperture of the camera must be changed between the optical and speckle imaging, recordings of BV and BF were not executed simultaneously but instead used the same stimulation protocol. Images were taken at 15Hz and the shutter speed was 10ms.

6.3.3 Stimulation protocol

Each stimulation onset had a 1s duration and a 19s interstimulus interval. The stimulus consisted in a 10Hz repetition of a 10ms square current pulse delivered by an electrical stimulator (WPI). The intensity was fixed depending on the value of the previously measured threshold. The typical value of the muscular threshold was $8\mu\text{A}$ and the stimulation intensities were at $4\times$, $6\times$, $8\times$ and $12\times$ threshold.

6.3.4 Optical imaging analysis

The evolution of the measured light intensity R is linked by the modified Beer-Lambert law to the incident light intensity R_i and to the absorbance A (Kohl et al., 2000). Here A depends on the concentration C and the molar extinction coefficient ϵ of the two chro-

mophores, HbO and HbR, and on the wavelength dependent path length factor $D(\lambda)$ originating from the scattering and diffusion properties of the tissue :

$$R(\lambda) = R_i(\lambda)e^{-A(\lambda)} \quad (6.1)$$

$$A(\lambda) = [\epsilon_{HbO}(\lambda)C_{HbO} + \epsilon_{HbR}(\lambda)C_{HbR}]D(\lambda) \quad (6.2)$$

HbO and HbR concentrations are usually recovered by recording the intensity at two or more wavelengths for which the linear system (6.2) is well conditioned.

During the activation, changes in absorbance $\Delta A = A - A_0$ were computed by dividing the intensity R by a baseline intensity R_0 :

$$\Delta A = -\ln\left(\frac{R}{R_0}\right) \quad (6.3)$$

To take into account the spectral width of LEDs and the non uniformity of the camera sensitivity further analysis was required. For a single chromophore having concentration C , the detected intensity on the camera was modeled by :

$$R(C) = \int d\lambda R_i(\lambda) S_c(\lambda) \exp(-\epsilon(\lambda)D(\lambda)C) \quad (6.4)$$

where $R_i(\lambda)$ describes the spectral width of the LED, $S_c(\lambda)$ models the camera sensitivity, and $D(\lambda)$ the path-length factor extracted from Kohl et al. (2000) for an assumed total hemoglobin concentration of 0.02 mmol.L^{-1} and a saturation value of 0.5. With the known spectra of the LED illumination, the response was modeled with :

$$R(C) = R_i \exp(-\epsilon_{eff}(\lambda)D(\lambda)C) \quad (6.5)$$

by fitting the first expression with the second. We observed that the effective model indeed fits the full response well (6.4) validating its usage. Finally, for each wavelength,

equation (6.2) was solved using a least-squares approach with the effective extinction coefficients.

6.3.5 Speckle imaging analysis

Blood flow was computed by calculating the spatial fluctuations of the speckle produced by the random mutual interferences of the coherent light originating from a laser diode. Moving scatterers create a time varying speckle pattern. When integrated over the exposure time of the camera, these fluctuations induce a blur in the raw image that are quantified by the spatial contrast K . This is defined as the ratio of the standard deviation to the mean intensity in a given spatial area. The contrast depends on the autocovariance of the speckle pattern $C_t(\tau)$ and on the exposure time of the camera T , and is related to the correlation time τ_c of the speckle (Goodman, 1984; Fercher and Briers, 1981).

$$K = \frac{\sigma_s}{\langle I \rangle} \quad (6.6)$$

$$K = \frac{1}{T} \int_0^T C_t(\tau) d\tau \quad (6.7)$$

$$K = \left[\frac{\tau_c}{2T} \left(1 - e^{-2T/\tau_c} \right) \right]^{1/2} \quad (6.8)$$

The correlation time is inversely proportional to the mean velocity of the scatterers ν . 5×5 pixel regions were used to calculate the contrast image. The relative variation of the blood flow $\Delta\nu/\nu_0$ was obtained by (Dunn et al., 2001, 2005) :

$$\Delta\nu/\nu_0 = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \quad (6.9)$$

6.3.6 Signal processing

Given the small amplitudes of the absorbance variations, the signal was averaged over 27 blocs for a total acquisition time of 9 min. The underlying hypothesis is that activation-related signal was highly correlated to the stimulation while surrounding noise was not. For each stimulation, we first estimated the baseline intensity R_0 and the baseline flow ν_0 by averaging the signal three seconds prior to the stimulation, considering that the hemodynamic from the previous stimuli had reached its rest level. Variations ΔA and $\Delta \nu / \nu_0$ were then calculated for the pre-stimulus (3s), the stimulus (1s), and the rest (17s) periods. Bloc averaged variations were then low pass filtered (in time) by a Chebyshev filter (1 Hz cut-off) to suppress frequencies higher than animal respiration and cardiac fluctuations. Note that IOI acquisition enabled high sampling rate relative to the physiological noise, preventing aliasing. A spatial Gaussian filter was applied to reduce camera noise (over 10 pixels with a 2 pixel standard deviation).

6.4 Results

6.4.1 Single wavelength imaging

Our initial set of experiments assessed that a reproducible hemodynamic response could be recovered from the preparation. The spinal cord was illuminated with a red, 637nm wavelength. It was chosen so that the Beer-Lambert law can be simplified, and that the variations of the reflected intensity are dominated by the variations of a single chromophore. Indeed, the extinction spectra of HbO and HbR at $\lambda = 637\text{nm}$ shows that $D \times \epsilon_{HbR} > 9 \times D \times \epsilon_{HbO}$ (Fig. 6.2), and the absorbance can then be approximated by $A = C_{HbR} \times \epsilon_{HbR} \times D$. Observed variations thus reflect the HbR concentration (Frostig et al., 1990; Devor et al., 2003).

Signal detection and Intensity dependence

Measured responses at different stimulation levels were obtained to characterize response variations between animals. Nine rats were used for the study. Their right or left sciatic nerve was stimulated with four different intensities, so that the ratio to threshold remained constant between animals. Stimulation strengths were $4\times$, $6\times$, $8\times$ and $12\times$ threshold and followed the protocol described above. For each animal, an ROI was designed over the activated site. Absorbance values were averaged in the ROI. All data were normalized to the maximum of absorbance absolute variation for the $8\times$ threshold data in each animal to account for physiological differences (cardiac, respiration, blood pressure).

We performed an unpaired bilateral and unequal t-Student test for each stimulation intensity as follows : For every time point between 0 and 17s after the stimulation, mean and standard deviation of the normalized intensity across animals were computed. Each of these time points was compared against the mean and standard deviation measured during the pre-stimulus period (-3 to 0s). For each stimulation intensity, the responses between 1 and 2s (initial dip), and between 5 and 6s (overshoot) after the stimulation were significant ($p=0.01$). This confirmed the presence of a stimulation-related signal in the spinal cord.

In Fig. 6.3.A, the amplitude of the temporal minimum of the absorbance curve is shown to be non linearly correlated with stimulation intensity. T-Student test was performed based on $|\Delta A|$ maxima between each of the four intensity condition. Significant differences were observed in most cases ($p=0.05$), as shown in (Table 6.1). The non linear intensity dependence with respect to threshold was fitted by the polynomial $M_1(I_T) = -0.013 I_T^2 + 0.298 I_T - 0.552$, indicating a saturation of the spinal cord hemodynamic response for intensities higher than $11.5 \times$ threshold. Moreover, we determined the average time to maximum of ΔA at $1.62 \pm 0.06s$ and time to minimum at $3.9 \pm 0.1s$. The

normalized hemodynamic response for each intensity was also determined. Fig. 6.3.B illustrates the averaged temporal variations for the four intensities.

TAB. 6.1 Probabilities associated with the t-Student tests.

Intensity	6×	8×	12×
4×	0.006	0.004	0.0021
6×	-	0.004	0.050
8×	-	-	0.236

Spatio-temporal evolution and vascular components

A stimulation at 8× threshold was used on the left sciatic nerve. A Region Of Interest (ROI) was manually selected by using the spatiotemporal evolutions of the absorbance. The absolute variations of absorbance were then averaged over the selected points and plotted in Fig. 6.4.B. About 2.25s after the stimulation, the mean absorbance decreased and reached a minimum of $-5.2 \times 10^{-3} (-\ln(I/I_0))$ at 4.80s, slightly earlier than what is expected in the brain for HbR (Devor et al., 2003). The full spatiotemporal evolution of the absorbance is shown in Fig. 6.4.A, illustrating the variations whose maximum absolute value was higher than half the maximum of the absorbance absolute variations in the ROI. As expected from the literature, the activation was localized at levels L₃-L₅ close to the sciatic afferences. It was mainly found in the ipsilateral side of the stimulation, although small venous contralateral changes were also noticed at 4.52 and 5.59s. Two maps of the measured spatiotemporal evolution are also illustrated in Fig. 6.4.C and Fig. 6.4.D. The first one represents the characteristic time and minimum value of ΔA_{ROI} . The second one was obtained by computing at every point (i, j) the biased cross correlation between the ROI averaged signal and the local variations at this point : $(\Gamma_{xy}(m))_{ij} = \frac{1}{N} \sum_{-N}^N x_m y_{n+m}^*$, where $x = \Delta A_{ROI}$ and $y = \Delta A_{ij}$. The time of the maximum indicates the time shift for which the two signals are the most similar. A negative index corresponds to a late activation compared to the ROI. Images coding both the temporal information and the similarity with the response were constructed. The time domain was coded in a 256 Hue-Saturation-Value (HSV) colored system and

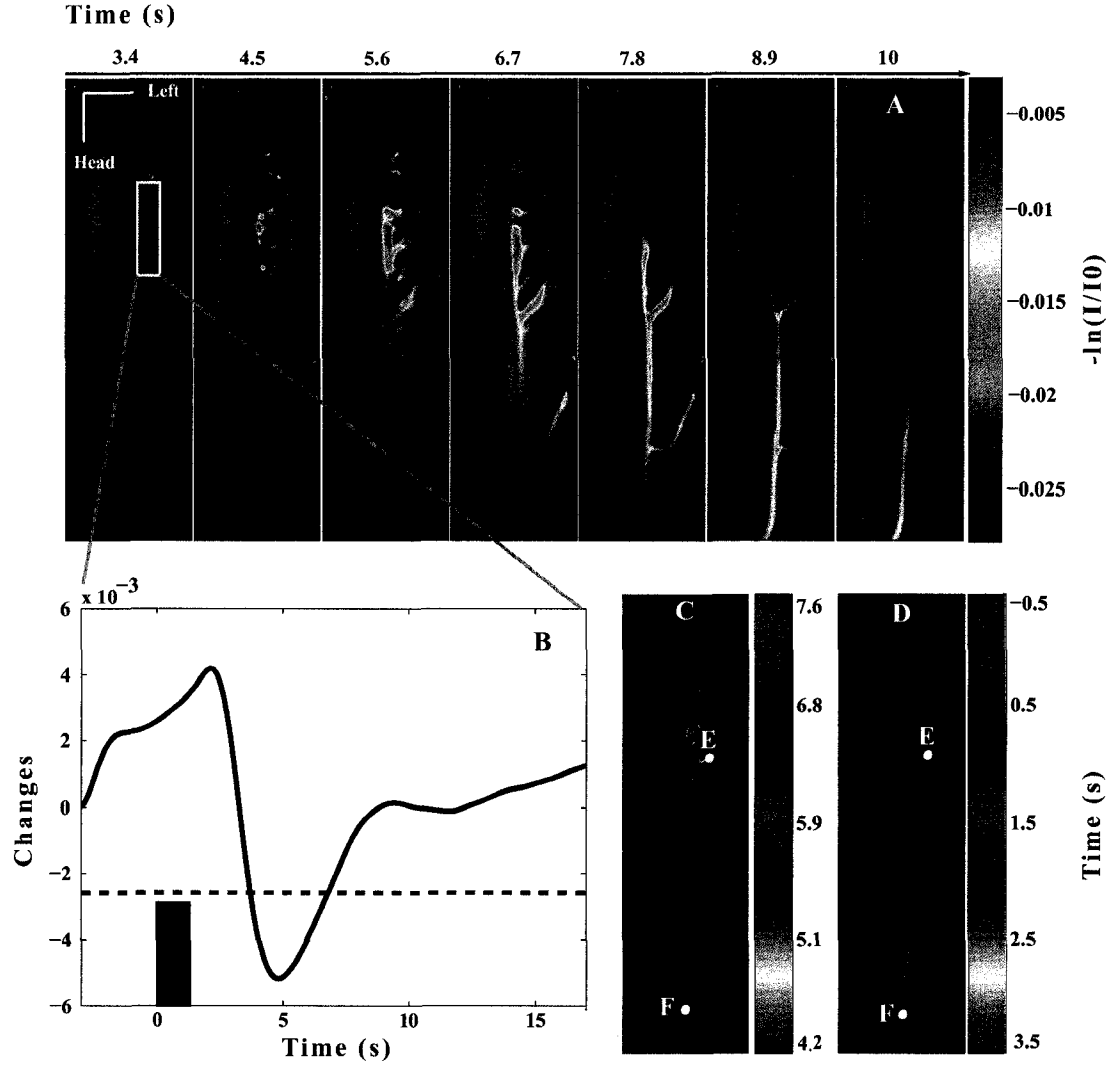


FIG. 6.3 (A) Evolution of the maximum absolute variation for each intensity. Bars stand for the maximum value of the normalized variations $|\ln(I/I_0)|$. Error bars represent the standard deviation over the trials for each intensity. Mean and standard deviation for $8\times$ threshold are respectively 1 and 0, since it was the normalization reference. The red curve was obtained by a polynomial curve fitting M_1 . (B) Average temporal variations of $-\ln(I/I_0)$ for the four intensities ($4\times$, $6\times$, $8\times$, and $12\times$ threshold) under a red illumination. (C) Average temporal variations of $\frac{\nu-\nu_0}{\nu_0}$ for three of the intensities ($4\times$, $8\times$, and $12\times$ threshold) using the speckle imaging method. The variations are averaged for a group of three animals.

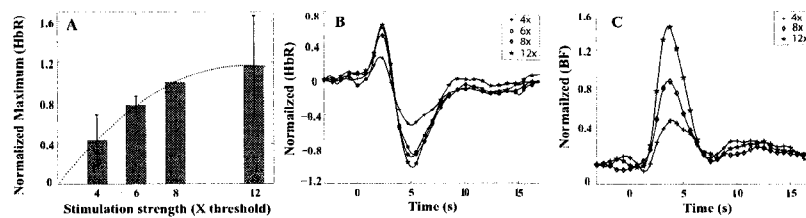


FIG. 6.4 (A) Spatiotemporal optical response on the dorsal spinal cord after a sciatic nerve stimulation (10Hz, 10ms, 0.09mA). Variations of ΔA thresholded by $0.5 \times$ the minimum are plotted on the anatomic image. This threshold is represented by the dotted line in (B). (B) Average variations of $-\ln \frac{I}{I_0}$ over the Region Of Interest (ROI) specified by the white rectangle in the anatomical image. The gray bar indicates the stimulation period. (C and D) Temporal map of activation by using the maximum (C) and the cross correlation (D) methods. The two colorbars represent the relative time (in s) to the stimulation onset and to the maximum of the averaged signal in the ROI.

the similarity was represented by the contrast. In both cases, hemoglobin propagation is clearly visible. In the cross correlation map for instance, the activation first occurred in the purple colored areas and the blood then flushed in the direction of the heart into the dorsal spinal vein displayed in green and yellow. These images validated the capability of intrinsic optical imaging to image the spinal cord. We also observed that large draining veins had significant contributions on images. Given that, the localization of activation was done on early times to be more sensitive to signal arising from the capillary bed where neurons activated. This method was further validated using $CMRO_2$ estimations as shown below.

6.4.2 Complete hemodynamic response

Due to the presence of strong vascular components, one session included multi-wavelength and laser speckle imaging. The goal was to provide a more complete picture of hemodynamic characteristics and to enable estimation of $CMRO_2$.

Multi-spectral imaging of HbR, HbO and HbT

Spatial and temporal changes of HbR, HbO and HbT following stimulation of the left sciatic nerve were computed for one animal by multiplexing the wavelengths. HbO, HbR, and HbT concentrations were similar to those already observed in the brain (Dunn et al., 2005). HbO peak occurs at 3.7s and is larger than the simultaneous decrease of the HbR concentration. HbT concentration reaches its maximum at $t = 3.3s$, 0.4s before HbO ($t = 3.7s$) while HbR lags HbO by 0.1s ($t = 3.8s$). Fig. 6.5(A, B, and C) reveals the areas for which variations are higher than $0.5 \times$ the maximum of the variations in the ROI.

Laser speckle analysis

The temporal evolution of the relative blood flow under the same experimental conditions is shown in Fig. 6.5.F. Relative blood flow changes are similar to what is temporally found in the brain with maximum amplitude of 11.7%. As expected the velocity changes occurs prior to the global volume changes. Increased blood flow is mostly localized on the left side of the spinal cord but non negligible contralateral activation is visible at 1.5s. Two more experiments were performed with Laser speckle imaging .Fig. 6.3.C shows the averaged time course of the normalized variations for each intensity. By accumulating data from the $8 \times$ and $12 \times$ threshold intensities, we observe a peak of the response at $2.9 \pm 0.5s$ with a full width at half maximum of $2.1 \pm 0.3s$. Contrary to Dunn et al. (2005), we did not observe the presence of a plateau after the maximum. This can be explained by a shorter stimulation of 1s against 10s. With blood flow and blood volume, we can estimate $CMRO_2$. Considering baseline concentrations of $60.10^{-4}M$ and $40.10^{-4}M$ for HbO and HbR (Dunn et al., 2005). We computed their relative changes and calculated $CMRO_2$ (Dunn et al., 2005) :

$$CMRO_2 = \left(1 + \frac{\Delta CBF}{CBF_0}\right) \left(1 + \gamma_R \frac{\Delta HbR}{HbR_0}\right) \times \left(1 + \gamma_T \frac{\Delta HbT}{HbT_0}\right)^{-1} \quad (6.10)$$

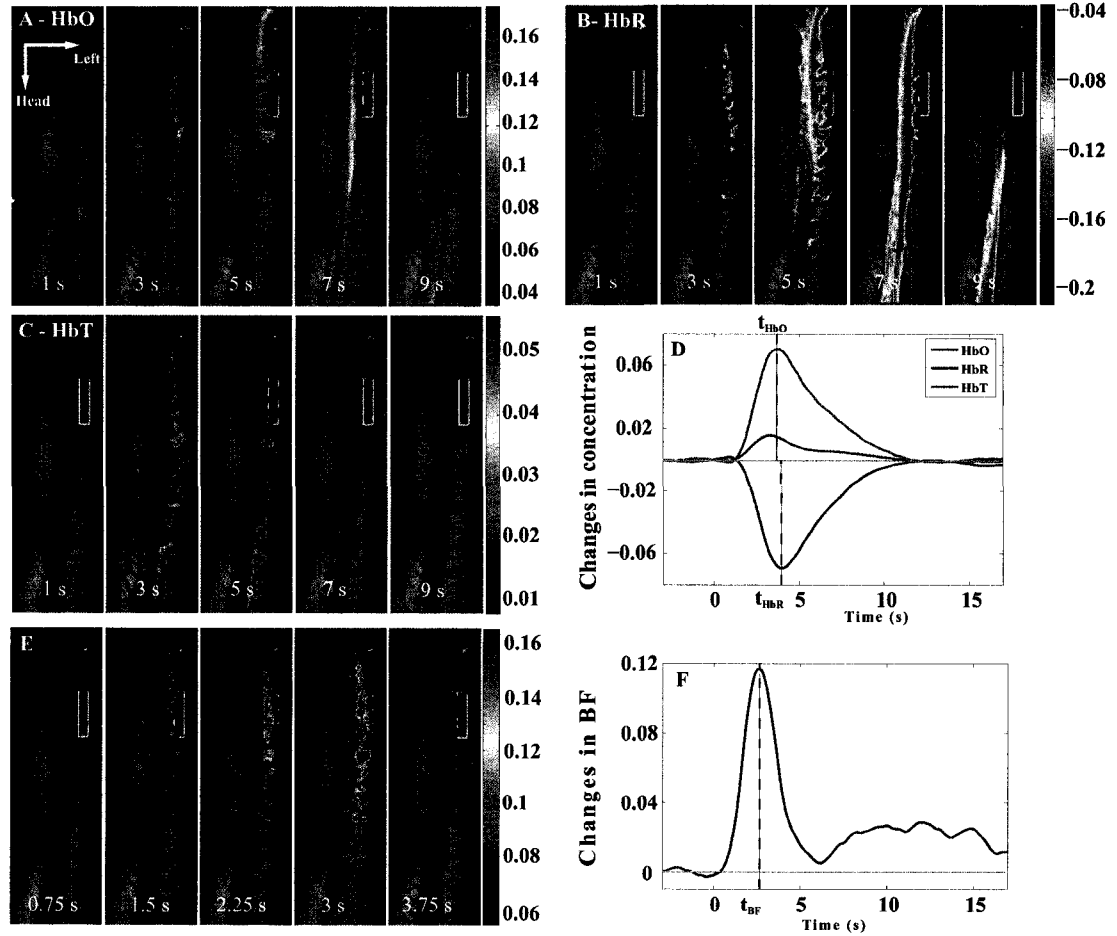


FIG. 6.5 (A-B-C) Spatio-temporal evolution with a 1s interval of ΔHbO (A), ΔHbR (B) and ΔHbT (C) following a 1s sciatic stimulation. Responses higher than 0.5 times the maximum variation in the selected ROI are shown superimposed on the anatomic image. Vascular compartments are clearly visible given that they integrate the response from a large area. (D) Evolution of the relative concentrations in HbO, HbR, and HbT over the selected ROI. (E) and (F) Spatio temporal evolution of the relative changes in blood velocity, and the corresponding time course.

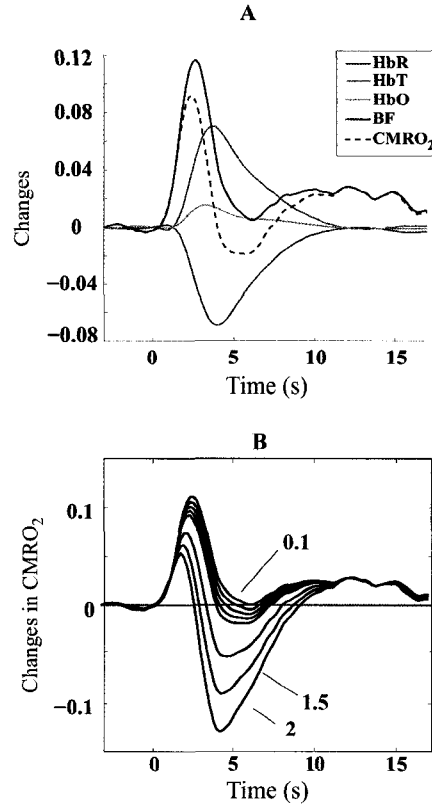


FIG. 6.6 (A) Time courses of the HbO, HbR, HbT and BF changes from baseline, and estimation of the CMRO₂ for $\gamma_R = 0.5$ and $\gamma_T = 0.5$. (B) The dependence of the estimated CMRO₂ on the values of γ_R and γ_T (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5 and 2).

The resultant time course is illustrated in Fig. 6.6.A for $\gamma_R = 0.5$ and $\gamma_T = 0.5$. We observe, however, that the CMRO₂ shape strongly depends on the choice of the two γ_R/HbR_0 and γ_T/HbT_0 (Fig. 6.6.B) and an estimation of baseline concentrations would be necessary to provide a more accurate CMRO₂ estimation.

Electrophysiological measurements

To further validate our observations, neuronal activation was directly measured at the end of the optical experiment using a tungsten micro-electrode with a resistance between 1 and 2 MOhms. The electrode was inserted directly into the spinal cord at the location

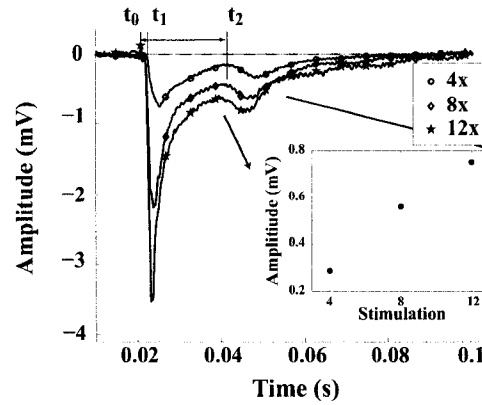


FIG. 6.7 Electrophysiological measure of the neuronal activation in the spinal cord consecutive to a 1ms stimulation of 8 $\times$ or 12 $\times$ threshold (dash line). The stimulation artefact is encircled and occurs at $t_0 = 21.5\text{ms}$. On the right, the values of the second maximums are plotted against the intensity of the stimulation.

where the maximum hemodynamic response was previously observed. The current stimulation was reduced to a single square pulse of 1ms to allow precise measurement of the latency and the conduction velocity. Fig. 6.7 shows the temporal variation of the measured voltage after three stimulations of 4 $\times$, 8 $\times$ and 12 $\times$ threshold. Two neuronal components can be observed in the recorded potential : 1) the antidromic motoneuron field potential at $t_1 - t_0 = 1.9\text{ms}$ and 2) the synaptic projections from the sciatic afferent neurons into the lumbar spinal cord at $t_2 - t_0 = 25\text{ms}$.

Area of activation

Spatial extent of HbO, HbR, HbT and BF significative changes was estimated by taking the pixels whose value at t_{max} , the maximum value of Fig.6.6A, is higher than 0.75 $\times$ than the same value averaged in the ROI. Moreover, a common area of activation measure was constructed by keeping the pixels that satisfy the above conditions for three components. To calculate the spatial extent of the activated response, vascular contributions were removed by a manual segmentation based on the anatomical image. Scaling was obtained by inserting a 1mm size object in the image, represented by a white line segment in Fig.

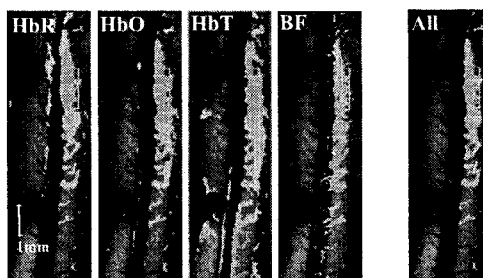


FIG. 6.8 For HbR, HbO, HbT and BF, the surfaces of activations are made with the pixels whose value at t_{max} is higher than $0.75 \times$ the maximum of the variation in the ROI. The last image represents the pixels that satisfy 3 of these 4 conditions.

TAB. 6.2 Surface and length of the spatial extent of the activation.

Parameter	HbR	HbO	HbT	BF	All
Length (mm)	4.2	4	5.54	5.72	4
Surface (mm ²)	3.9	3.75	7.54	3.72	2.8

6.8 (HbR). Areas and lengths for HbO, HbR, HbT and BF are indicated in Tab. 6.2. Those values shows a good consistency in area of activation for both types of measurement, i.e., concentration and BF measurements. Spatial maps of these surfaces are provided in Fig.6.8. Their length and surface are respectively comprised between 4-5.7mm and 2.8-3.9mm². HbT activation is more spread due higher vascular contribution.

6.5 Discussion

In this work we first aimed to confirm previous results and establish whether optical imaging can be used to spatially and temporally map spinal cord functions in response to a given stimulus. Our second aim was to better quantify the response in the anaesthetized rat spinal cord and explore whether a multi-modal approach measuring blood volume and blood flow could be leveraged towards a more complete characterization of the full hemodynamic response function (HRF). This characterization might be of great interest for fMRI studies, in which the standard way of detecting an activation is to perform a

general linear model using the design matrix convolved with an assumed HRF.

Optical imaging has many advantages for small animals : it has low cost and provides measures of blood flow, blood oxygenation and blood volume. Moreover the level of sensitivity achieved in this study is comparable if not better than fMRI results shown in similar preparations (Zhao et al., 2007). Estimation of CMRO₂ provides a more direct measure of neuronal activation. It could be of great interest in animal preparation with spinal cord injury, since the occlusion of large arteries and veins created by the lesion might alter the vascular response. On the other hand there are significant drawbacks when compared to fMRI as IOI is invasive. The depth at which the spinal cord can be imaged with this technique is relatively small (600 μm) and limits our ability to image motoneurons or larger animals.

Our results confirm and extend previous work (Sasaki et al., 2003, 2002) and the reliability obtained from animal to animal indicates that the technique will be amenable to group studies of animals following spinal cord injuries.

6.5.1 Hemodynamic of the spinal cord

Temporal characteristics

The temporal characteristics of HbR variations are consistent with other studies performed in the rat brain with similar anaesthesia. We found an initial dip at 1.62s and an incoming flow at 3.9s. Respectively to those values, Sheth et al. (2003) found 1.25s and 3.75 to 4.25s in the brain, at $\lambda = 610\text{nm}$. And Sasaki et al. (2002) found an initial dip at 1.5s in the cervical spinal cord at $\lambda = 650\text{nm}$ and similar stimulation paradigm. Those results suggest higher reactivity in the spinal cord than that in the brain, as already supported in (Nix et al., 1976). Differences observed between Sasaki et al. (2002) and the present work may be explained by differences in the wavelength used, or in the topo-

logy of the vasculature itself. Flow changes were estimated to peak at about 1.8s which is faster than values obtained by Dunn et al. (2005) in the brain (2.7s for an hindpaw stimulation and 2.8s for a forepaw stimulation). Temporal maps of oxymetric changes nicely described trajectory of the blood from the capillary bed to large draining veins (Fig. 6.4.C and D). Interestingly, we detected a relatively long delay between those two spatial locations. The calculated time delay between the points E and F of the figures 6.4.C and D were estimated at 3.3s with the cross correlation technique, and at 3.7s with the maxima method. The distance between E and F is 7mm, yielding blood velocities of 2.1mm.s^{-1} and 1.9mm.s^{-1} . One should be careful in taking this last value since the size and elasticity of vessels play a role in these velocities.

Anaesthetic also has a strong impact in the HRF. For some animals, we used ketamine and performed two runs with identical stimulation paradigm. Interestingly, we observed a response that was 2-3s later than that using alpha-chloralose. We also observed a decrease of the response amplitude.

Spatial characteristics

Activation surfaces presented in Fig. 6.8 match the work performed in BOLD-based fMRI by Zhao et al. (2007) who measured an activation length of about 5mm after a sciatic stimulation. The spatial extent is also consistent with previous studies (Panneton et al., 2005; Leong and Tan, 1987; Lawrence et al., 2004) that localized the projection of the sciatic nerves in the L3-L5 region of the spinal cord. Though most of the activation was ipsilateral, weak contralateral activation was also visible in Fig. 6.5.A-B and E at 3s and in Fig. 6.8. This can be explained by the recruitment of the commissural interneurons. Once excited in the ipsilateral side, they stimulate the contralateral interneurons as their axons cross the midline and thus play an essential role for the coordination between the left and the right sides during locomotion (Quinlan and Kiehn, 2007; Eide et al., 1999). The spatial precision coupled with the sensitivity of intrinsic imaging methods allows the recording of this specific distribution. Present results also demonstrate the significant

vascular changes induced by venous washout in large veins. In fMRI, the size veins may be on the order of a voxel and venous washout could be confounded with the hemodynamics occurring in the micro-vasculature.

Canonical hemodynamic and metabolic response

The temporal courses of HbO, HbR, HbT and BF are similar to the ones observed in the brain but occur slightly earlier (Dunn et al., 2005). Our experiment demonstrates that the BF rise occurs prior to the oxymetric changes by about 1s (Fig. 6.5.E and F). HbT peaks prior to HbO and HbR and a small time delay is observed between HbO and HbR peaks, as observed in the human brain (Coehn-Adad et al., 2007).

CMRO₂ estimations were based on higher values of HbR and HbT than that in the brain. This choice is questionable : the vasculature density is not expected to be the same in the cord. Our estimation thus became dependant on two scaling parameters : γ_r and γ_t . By modulating those parameters, we observed that for large values of γ_r , CMRO₂ becomes negative and consequently does not reflect the physiology (Fig. 6.6). The difficulty of CMRO₂ estimation lies in finding the equilibrium between differences existing in the shapes of concentrations and blood flow. The delay between blood flow ($2.9 \pm 0.50s$) and concentrations ($3.9 \pm 0.1s$) peak times and the sharp shape of the velocity evolution implies that CMRO₂ is only affected by the blood flow before 3s and more strongly by the HbR and HbT concentrations between 4s and 6s. Our results indicate that more information and measures will be necessary to infer a more realistic CMRO₂ in the spinal cord.

6.5.2 Validation

Results were validated by both a group study (n=9) and electrophysiology measurements.

Inter-rat variations of the response strength against intensity

In addition to characterizing the HRF, we evaluated the reproducibility of responses. This is obviously crucial in studies aiming at comparing normal versus spinal cord injured populations. Our results confirm that the hemodynamic response in the spinal cord is reproducible for this specific preparation. The group study over the normalized variations provided an average evaluation of the HbR time course after the stimulation (Fig. 6.4.B). Moreover, significant differences shown between three of the four intensities confirm the progression of the response strength with the stimulation (Fig. 6.3.A). At high thresholds we observed a saturation of the response that was also noticed by Sasaki et al. (2002) with data obtained from a single animal. Nevertheless, the saturation was not visible in the speckle data. The latter can be explained by the lack of experiments ($n=3$) using this technique by comparison with the optical imaging ($n=9$).

Electrophysiology

The amplitude of field potentials, which has been widely used to determine the neuronal activity in the spinal cord (Tomizawa et al., 2008; Noga et al., 1995) was well correlated with optical imaging measurements. We argue that the neuronal activation recorded with the optical imaging was provided by interneurons for two reasons. First, the population of neurons into the spinal cord is composed of 97% interneurons and 3% motoneurons (Willis and Coggeshall, 1991) and we thus expect hemodynamics from the first ones to be observed. Second, the focal point of the objective was set at $600\mu\text{m}$ below the surface of the dorsal spinal cord. Therefore, it is reasonable to believe that the optical imaging technique mostly recorded the dorsal horn activity, since the motoneurons are located at $1000\text{--}1200\mu\text{m}$ depth in rats (Nix et al., 1976). This supports previous work (Sasaki et al., 2002) using a synaptic blocker. The electrode was positioned into the sciatic motoneuron pool to obtain a maximum antidromic volley (latency of 2ms) since the localized anti-

dromic response was helpful in allowing a consistent electrode positioning in each rat. Thus the correlation between the amplitude of the optical imaging and the electrophysiology was done with the sciatic afferent volley, which is characterized by the second field potential wave (Fig. 6.8). By cutting the dorsal roots on the lumbar spinal cord, previous work showed a loss of the second component without modifying the amplitude of the antidromic response that is carried by the ventral roots (Beaumont and Gardiner, 2002).

6.6 Conclusion

This study demonstrated that spatio temporal characteristics of the neuronal activation in the lumbar spinal cord can be accurately measured by intrinsic optical imaging. Our results are consistent with other intrinsic imaging studies in the brain and in the cervical spinal cord, and with fMRI studies in the lumbar spinal cord. The observed reproducibility in optical and speckle imaging, and the dependence on the stimulation strength signal, confirm that this method could be used to characterize pathologic situations. Although we computed the metabolic response, we believe that more work is necessary to get an accurate estimation of $CMRO_2$ using optics.

We hope that precise recordings of the neuronal activation in the spinal cord will open the door to studies of post traumatic recovery following spinal cord injury. Measuring differences between the neuronal organisations and associated hemodynamic responses before and after injury will be the subject of future investigations.

6.7 Acknowledgments

N. Brieu was supported by a MITACS internship. This work was supported by a NSERC discovery grant. The experiments were performed at the Centre de Recherche, Hôpital du Sacré Coeur de Montréal.

CHAPITRE 7

CONSÉQUENCES D'UNE SECTION SUPÉRIEURE DE LA MOELLE

Nous avons établi dans la dernière partie la possibilité d'imager la réponse hémodynamique dans la moelle épinière aussi bien par imagerie optique que par imagerie par speckle. L'objectif de cette étude était de constituer un groupe témoin afin de pouvoir évaluer les implications d'une lésion de la moelle. En effet, bien que 11 000 nouveaux cas sont à déplorer chaque année rien qu'aux Etats-Unis d'après la National Spinal Cord Association (<http://www.spinalcord.org/>), un nombre limité de traitements est actuellement sur le marché. Mieux comprendre les mécanismes de réorganisation de la structure neuronale en situation post-traumatique permettrait de préciser l'action des médicaments sur l'amélioration des connexions nerveuses et de découvrir éventuellement des nouvelles voies de traitement. Nous avons donc appliqué les techniques d'imagerie intrinsèque afin de mettre en relief les conséquences d'une lésion complète de la moelle au niveau cervical sur la réponse hémodynamique mesurée dans la région lombaire. Des études affirment que des différences dans l'organisation de la réponse sont visibles et sont dues soit à la mort des cellules neuronales, soit à leur régénération. Cela pourrait expliquer la récupération fonctionnelle parfois observée après un traumatisme selon Di Giovanni et al. (2004); Kalb and Strittmatter (2000). Etudier la réorganisation neuronale pourrait permettre à long terme de mieux comprendre cette récupération.

7.1 Protocole chirurgical

Le protocole chirurgical relatif à l'acquisition des données est identique à celui décrit au chapitre 3.1. Pour pratiquer la section complète de la moelle, l'animal est anesthésié,

puis la moelle est exposée au niveau thoracique inférieur par une incision dorsale. Elle est alors sectionnée à l'aide d'un scalpel sur toute sa profondeur. Finalement, l'incision est refermée avec une agrafe.

7.2 Conséquences sur la concentration en HbR

Trois expériences sur des rats ayant subi une lésion complète de la moelle ont été menées et ont permis d'aboutir à la même modification générale de la réponse hémodynamique. Ces résultats doivent cependant être confirmés sur un nombre plus conséquent d'animaux. Les résultats obtenus sont résumés à l'Annexe II.

D'après les conclusions établies lors de l'étude de groupe décrite au chapitre précédent, la réponse hémodynamique de la moelle épinière lombaire est très semblable à celle communément observée dans le cortex : la concentration en HbR se caractérise à la fois par la présence d'un *initial dip* positif dans les premières secondes suivant la stimulation, puis par un pic positif quelques secondes après. Cependant, les expériences menées chez des rats lésés selon le même protocole montrent des modifications importantes de ce décours. La figure 7.1(b) illustre le décours temporel obtenu après l'analyse des données issues de l'expérience R29E24. L'*initial dip* est encore présent et atteint un maximum à 3.2 s. Le confinement de sa localisation spatiale à une zone concordante avec les régions déterminées lors des expériences sur les rats sains (Figure 7.1(c) et Figure 7.1(a)), et son temps d'apparition éloigné de la première seconde post stimulation, permettent de vérifier qu'il s'agit effectivement de l'*initial dip* et non d'un artéfact de stimulation. Les points essentiels sont que la diminution d'absorbance relative au flush sanguin n'est plus visible, et que le maximum de l'*initial dip*, estimé sur l'ensemble des expériences, est en retard (3.2 ± 0.5 s) par rapport à celui enregistré chez les rats non lésés.

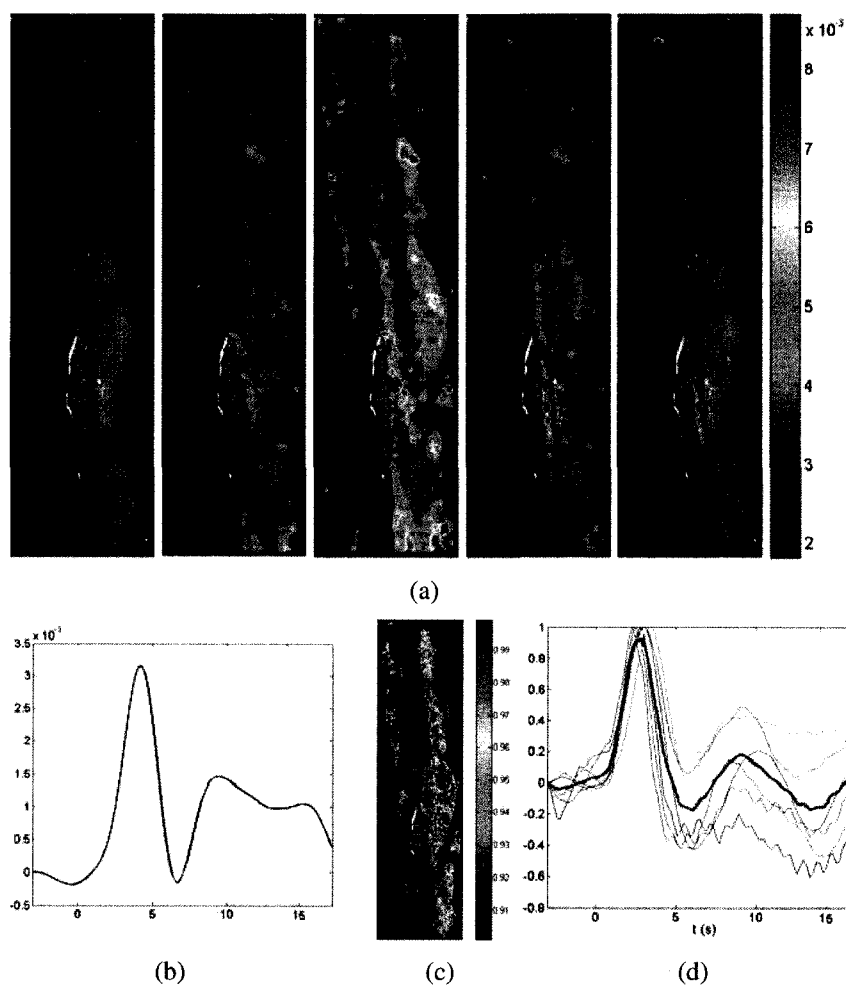


FIG. 7.1 (a) Variations entre 0 et 4 s de l'absorbance après une stimulation de 0.06 mA pour $\lambda = 637$ nm, dans le cas d'un rat lésé (R29E24). (b) Décours temporel correspondant pour t variant de -3 à 7 s. (c) Carte de corrélation ($C > 0.9$) superposée à l'image anatomique. (d) Décours temporels normalisés selon leur maximum pour les expériences considérées. La moyenne des décours est tracée en rouge.

7.3 Conséquences sur la vitesse

Sur deux des trois rats lésés, nous avons également enregistré les variations de la vitesse sanguine par speckle. Dans la majorité des expériences menées (5/8), aucune variation significative de vitesse n'a été détectée ; dans trois cas, le décours temporel se caractérise par un pic de vitesse mais l'augmentation n'est pas localisée. En comparaison avec les résultats obtenus chez les rats sains qui avaient permis d'établir une variation localisée de la vitesse dans 11 cas sur 13, nous pouvons conclure que la lésion inhibe les changements de vitesse au sein de la moelle, ou tout du moins les modifie profondément.

7.4 Interprétation

Nous avons déjà mis en évidence que la réponse hémodynamique est une appréciation indirecte de l'activation neuronale puisque nous déterminons sa réponse vasculaire. En effet, le flush sanguin, caractérisé par une augmentation de la vitesse dans les capillaires et par la diminution de la concentration en HbR, est subordonné à la dilatation des artérioles et donc à l'organisation vasculaire de la moelle. Au contraire, l'*initial dip* qui résulte supposément de la consommation d'oxygène et de l'augmentation de la concentration de HbR dans les capillaires en est indépendant. Etudier l'architecture neuronale post-traumatique contraint de conserver un couplage neurovasculaire identique. Les résultats présentés ci-dessus contredisent cette affirmation. En effet, la lésion complète de la moelle impose la rupture des artères spinales antérieures et postérieures qui d'après Lamin and Bhattacharya (2003) irriguent respectivement soit la matière grise antérieure et la périphérie de la moelle, soit la matière blanche postérieure (Figure 7.2(a)). L'alimentation de ces artères est assurée par les artères vertébrales, cervicales, intercostales et sacrées latérales (Greathouse et al., 2001) dérivées de l'aorte (Figure 7.4). Même si ces résultats sont présentés pour des humains, on peut considérer que la structure vasculaire

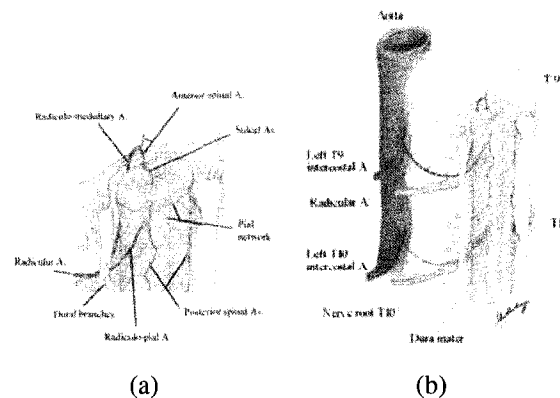


FIG. 7.2 Vascularisation de la moelle épinière par les artères spinales antérieure et postérieure (a) connectées à l'aorte par les veines intercostales thoraciques (b)(Lamin and Bhattacharya, 2003).

générale est identique à celle du rat. La présence de ces multiples sources d'alimentation sanguine peut expliquer comment la moelle peut survivre à la lésion cervicale pratiquée qui induit la suppression des liaisons avec les artères vertébrales et cervicales.

L'absence de flush sanguin, confirmée à la fois en optique par la disparition de la diminution de la concentration en HbR et en speckle par celle du pic de vitesse, peut s'expliquer par la diminution de l'approvisionnement sanguin qui est alors insuffisant pour satisfaire la hausse de la demande consécutive à l'excitation des neurones. Cela remettrait en doute le principe selon lequel la réponse hémodynamique est un processus purement local puisque la perturbation de l'alimentation sanguine générale de la moelle modifierait profondément la réaction vasculaire locale. Dans ce cas, l'hypothèse énoncée afin de mener la comparaison entre les deux activations neuronales ne tient plus.

L'étude des implications d'une baisse de l'alimentation sanguine sur la réponse hémodynamique est cependant une étude suffisamment intéressante. Elle permet en effet de mesurer effectivement l'importance de l'*initial dip* avant qu'il ne soit submergé par la réponse vasculaire. Ainsi, lorsque l'on moyenne le temps d'arrivée du maximum de l'absorbance sur l'ensemble des expériences de rats lésés, la concentration en HbR culmine

à 3.2 s contre 1.6 s pour les rats sains. Un test de student bilatéral et homéoscédastique mené sur les temps des deux groupes sains/lésés permet d'estimer la probabilité d'erreur à émettre l'hypothèse qu'ils sont différents à 0.002. La distinction entre les deux groupes est donc statistiquement établie sur ce critère. Cette distinction peut s'expliquer par le fait que chez les rats non lésés, l'augmentation de la concentration en HbR est dépassée par l'augmentation du volume et du flot sanguin. Chez les rats lésés, l'augmentation du flot sanguin étant inexistante, ce phénomène ne se produit pas et la courbe de la concentration en HbR pourrait représenter directement la consommation d'oxygène.

En conclusion, en débutant cette étude, nous nous attendions à remarquer une augmentation de l'activité neuronale. Cependant, la modification profonde de la réponse hémodynamique nous empêche de mener une comparaison fiable des deux groupes.

CHAPITRE 8

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les objectifs que nous nous étions fixés au début de ce projet ont été remplis mais peuvent encore être améliorés. Ce chapitre s'attardera à énoncer les objectifs décrits dans l'introduction, à discuter de leur atteinte et des améliorations envisageables.

- *Mettre en oeuvre l'appareillage nécessaire aux mesures, construire l'ensemble de la chaîne d'acquisition et de traitement des données.* Cet objectif a été complété mais peut encore être amélioré. Nous avons vu à la partie décrivant le principe de l'estimation par moyennages successifs que les rythmes physiologiques de l'animal peuvent se synchroniser avec la stimulation électrique. Forcer la désynchronisation des deux événements en faisant intervenir les stimulations selon un ordre le plus aléatoire possible permettrait d'assurer des meilleurs résultats. Plusieurs pistes peuvent être implémentées : générer un temps inter-stimulation aléatoire entre 20 et 21 s, intercaler différentes intensités, etc... Cela nécessite d'enregistrer la durée et les caractéristiques de chaque bloc, mais permet de minimiser l'influence des changements physiologiques. Concernant l'éclairage, augmenter le nombre de longueurs d'onde utilisées permettrait de réduire les erreurs commises lors de la détermination des concentrations. Il faut de plus veiller à ce que les coefficients d'extinction de HbO et HbR soient du même ordre de grandeur pour ne pas déséquilibrer la résolution du système d'équations.

- *Confirmer la viabilité du système par des tests in vitro et in vivo.* L'étape de test a été validée et nous a permis de vérifier à la fois les principes de l'imagerie intrinsèque et le fonctionnement correct de notre système d'acquisition et d'analyse. En effet, les

résultats obtenus *in vivo* en imagerie par speckle et décrits à la partie 5.1.2 sont semblables aux résultats présentés par Briers (2007), et ceux issus de l'imagerie intrinsèque nous ont permis de déterminer les paramètres expérimentaux à conserver. Néanmoins, d'autres tests peuvent être mis en oeuvre et notamment la calibration de l'imagerie par speckle via la détermination du paramètre **a** qui dépend des caractéristiques du milieu. La combiner avec une autre méthode de mesure de la vitesse (par mesure Doppler par exemple) permettrait de déterminer la vitesse réelle et de déduire la valeur de **a** et donc d'obtenir des valeurs absolues de la vitesse.

- *Confirmer sur un nombre de rats plus important la stabilité des résultats avec ces paramètres.* La dépendance de la réponse par rapport à l'intensité de la stimulation a été démontrée par l'étude de groupe présentée au chapitre 6. Nous avons néanmoins précisé lors de la recherche bibliographique que la force de la réponse dépend également de la fréquence et de la durée de la stimulation. Les mêmes études devraient aussi être menées sur le moelle épinière. De plus, augmenter le nombre d'expériences sur le même animal permettrait de mesurer ses variations propres par rapport à la réponse, et donc de s'assurer de la validité de la valeur considérée pour l'étude de groupe. L'étude de groupe ayant porté sur les variations normalisées de la force de la réponse, montrer une relative stabilité de la réponse sans normalisation serait une avancée importante dans la compréhension de la réponse hémodynamique.

- *Etudier les conséquences d'une section complète de la moelle épinière.* Augmenter le nombre d'animaux utilisés est la première amélioration nécessaire. Cela est d'autant plus important qu'aucune étude n'a été pour l'instant effectuée sur ce sujet et ne peut donc servir de validation aux observations formulées et aux interprétations consécutives, notamment l'absence de chute de la concentration en HbR et d'une augmentation localisée du flot sanguin. De plus, l'opération chirurgicale de lésion complète, qui inclut la rupture

de certaines veines et artères, induit des changements vasculaires trop conséquents pour être ignorés. Trouver un moyen de réaliser la section de la moelle sans devoir couper la veine et l'artère spinale permettrait de déterminer les répercussions de cette liaison sur la réponse neuronale et non pas sur la réponse vasculaire. On pourrait dès lors faire l'hypothèse que le couplage neurovasculaire n'a pas été modifié. Une solution de problème a été soulevée par M. Pierre Savard lors de la présentation orale de ce mémoire : l'ablation Radio Fréquence (RF) de la moelle permettrait de ne pas endommager ces vaisseaux sanguins.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Le but et l'originalité de cette étude réside dans l'intérêt d'imager une région très peu étudiée jusqu'à présent afin de faire ressortir des caractéristiques comparables avec celles déjà calculées par d'autres études dans le cortex. Nous avons ainsi confirmé que la séquence des événements consécutifs à l'activation neuronale déjà décrite dans le cortex se produit également dans la moelle : tout d'abord une augmentation de la concentration en HbR, puis une augmentation du flot sanguin qui entraîne la diminution importante de la concentration en HbR et la hausse de la concentration en HbO.

Les résultats prometteurs obtenus et présentés dans ce travail poussent à continuer l'étude de la moelle épinière tout en persévérant dans l'amélioration du système que nous avons conçu dans le cadre de ce travail. Des voies de recherche plus générales que celles que nous avons abordées en discussion sont envisageables. La plus grande question à laquelle ne permettent pas de répondre les techniques actuelles d'imagerie intrinsèque est la distribution en profondeur de l'activation. Plusieurs solutions peuvent néanmoins être envisagées ; tout d'abord, comme l'a déjà fait Sasaki et al. (2002), mouvoir le système optique de la caméra selon l'axe des profondeurs et remarquer l'évolution de la force et de la surface d'activation, ensuite utiliser l'imagerie optique laminaire qui permet d'obtenir des cartes tri-dimensionnelles de l'activation à partir d'un système plus complexe, comme décrit dans Hillman et al. (2007, 2004). La force et la surface de l'activation dépendant de la profondeur de mise au point, mener une étude inter animal plus précise devrait prendre en compte ce paramètre. Cela permettrait d'obtenir une plus grande stabilité des résultats d'un animal à l'autre.

RÉFÉRENCES

- Ayata, C., Dunn, A., Gursoy-Özdemir, Y., Huang, Z., Boas, D., Moskowitz, M., 2004. Laser speckle flowmetry for the study of cerebrovascular physiology in normal and ischemic mouse cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 24, 744–755.
- Beaumont, E., Gardiner, P., 2002. Effects of daily spontaneous running on the electrophysiological properties of hindlimb motoneurons in rats. *The Journal of Physiology* 540 (1), 129–138.
- Betram, D., Barres, C., Cheng, Y., Julien, C., 2000. Norepinephrine reuptake, baroreflexes dynamics and arterial pressure variability in rats. *Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 279, 1257–1267.
- Bonner, R., Nossal, R., 1981. Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue. *Applied Optics* 20 (12), 2097–2107.
- Boutillier, B., Outrequin, G., 2007. La moelle épinière (2) Anatomie fonctionnelle, Tiré de www.anatomie-humaine.com.
- Briers, J., 2001. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiological Measurement* 22, 65–66.
- Briers, J., 2007. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow. *Optica Applicata* 37 (1/2), 139.
- Brooks, J. C., Beckman, C. F., Miller, K. L., Wide, R. G., Porro, C. A., Tracey, I., Jenkinson, M., 2008. Physiological noise modeling for spinal functional magnetic resonance imaging studies. *NeuroImage* 39, 680–692.
- Cardoso, J., 2002. Analyse en composantes indépendantes. Actes des XXXIV iems Journées de Statistique.

- Castroman, P., Ness, T., 2001. Ketamine, an N methyl D aspartate receptor antagonist, inhibits the spinal neuronal responses to distension of the rat urinary bladder. *Anesthesiology* 96, 1410–1419.
- Chang, C., Shyu, B., 2001. A fMRI study of brain activations during non-noxious and noxious electrical stimulation of the sciatic nerve of rats. *Brain Research* 897 (1-2), 71–81.
- Cheng, H., Luo, Q., Zeng, S., Chen, S., Cen, J., Gong, H., 2003. Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution. *Journal of Biomedical Optics* 8, 559.
- Coehn-Adad, J., Chapuisat, S., Doyon, J., Lina, J.-M. Benali, H., Lesage, F., 2007. Application of the general linear model to response estimation in optical imaging. *Medical Imaging Analysis* 27.
- Deneux, T., 2006. Hemodynamic models : investigation and application to brain imagery analysis. Ph.D. thesis, Ecole doctorale polytechnique, Palaiseau.
- Devor, A., Dunn, A., Andermann, M., Ulbert, I., Boas, D., Dale, A., 2003. Coupling of total hemoglobin concentration, oxygenation, and neural activity in rat somatosensory Cortex. *Neuron* 39 (2), 353–359.
- Di Giovanni, S., Faden, A., Yakovlev, A., Duke-Cohan, J., Finn, T., Thouin, M., Knobloch, S., De Biase, A., Bregman, B., Hoffman, E., 2004. Neuronal plasticity after spinal cord injury : identification of a gene cluster driving neurite outgrowth. *The FASEB Journal* 19 (1), 153–154.
- Dunn, A., Bolay, H., Moskowitz, M., Boas, D., 2001. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 21, 195–201.
- Dunn, A., Devor, A., Bolay, H., Andermann, M., Moskowitz, M., Dale, A., Boas, D., 2003. Simultaneous imaging of total cerebral hemoglobin concentration, oxygenation, and blood flow during functional activation. *Optics Letters* 28 (1), 28–30.

- Dunn, A., Devor, A., Dale, A., Boas, D., 2005. Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex. *Neuroimage* 27 (2), 279–290.
- Durduran, T., Burnett, M., Yu, G., Zhou, C., Furuya, D., Yodh, A., Detre, J., Greenberg, J., 2004. Spatiotemporal quantification of cerebral blood flow during functional activation in rat somatosensory cortex using laser-speckle flowmetry. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 24, 518–525.
- Eide, A., Glover, J., Kjaerulff, O., Kiehn, O., 1999. Characterization of commissural interneurons in the lumbar region of the neonatal rat spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 403 (3), 332–345.
- Fercher, A., Briers, J., 1981. Flow visualization by means of single-exposure speckle photography. *Optics Communications* 37 (5), 326–330.
- Flury, B., 1988. Common principal components & related multivariate models. John Wiley & Sons.
- Frostig, R., Lieke, E., Ts'o, D., Grinvald, A., 1990. Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (16), 6082–6086.
- Girouard, H., Iadecola, C., 2006. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of Applied Physiology* 100 (1), 328–335.
- Givers, N., Beghin, J., Van Goethem, J., Michiels, J., Van den Hauwe, L., Vandervliet, E., Parizel, P., 2007. Functional MRI of the cervical spinal cord on 1.5T with finger tapping : to what extent is it feasible ? . *Neuroradiology* 49, 73–81.
- Goodman, J., 1984. Statistical properties of laser speckle patterns. *Laser Speckle and Related Phenomena*, 15–19.

- Goussard, Y., 2007. Applications médicales de l'informatique, traitement de signaux biomédicaux. CoursGBM6103.
- Greathouse, D., Halle, J., Dalley, A., 2001. Blood supply to the spinal cord, Letters and responses. *Phys term* 81, 1264–1265.
- Grinvald, A., Shoham, D., Shmuel, A., Glaser, D., Vanzetta, I., Shtoyerman, E., Slovín, H., Wijnbergen, C., Hildesheim, R., Sterkin, A., et al., 1999. In-vivo optical imaging of cortical architecture and dynamics, Technical report. Modern Techniques in Neuroscience Research.
- Hathout, G., Varjavand, B., Gopi, R., 1999. The early response in fMRI : A modeling approach. *Magnetic Resonance in Medicine* 41 (3), 550–554.
- Hewson-Stoate, N., Jones, M., Martindale, J., Berwick, J., Mayhew, J., 2005. Further nonlinearities in neurovascular coupling in rodent barrel cortex. *Neuroimage* 24 (2), 565–574.
- Hillman, E., Boas, D., Dale, A., Dunn, A., 2004. Laminar optical tomography : demonstration of millimeter-scale depth-resolved imaging in turbid media. *Optics Letters* 29 (14), 1650–1652.
- Hillman, E., Devor, A., Bouchard, M., Dunn, A., Krauss, G., Skoch, J., Bacskaï, B., Dale, A., Boas, D., 2007. Depth-resolved optical imaging and microscopy of vascular compartment dynamics during somatosensory stimulation. *NeuroImage* 35, 89–104.
- Hua, G., Jingjin, L., Guowei, L., 2000. Effects of ketamine on neuronal activity of the spinal dorsal horn in rats with unilateral hindpaw inflammation. *Acta Physiologica Sinica* 52 (4), 351–353.
- Hunt, C., 1954. Relation of function to diameter in afferent fibers of muscle nerves. *The Journal of General Physiology* 38 (1), 117–131.
- Hyvarinen, A., 1999. Fast and robust fixed-point algorithms for independent component analysis. *IEEE Transactions on Neural Networks* 10 (3), 626–634.

- Hyvarinen, A., Oja, E., 1997. A fast fixed-point algorithm for independent component analysis. *Neural Computation* 9 (7), 1483–1492.
- Julien, C., 2006. The enigma of Mayer waves : Facts and models. *Cardiovascular Research* 70 (1), 12–21.
- Kalb, R., Strittmatter, S., 2000. *Neurobiology of spinal cord injury*. Humana Press, Totowa.
- Kemna, L., Posse, S., 2001. Effect of respiratory CO₂ changes on the temporal dynamics of the hemodynamic response in functional MR Imaging. *Neuroimage* 14 (3), 642–649.
- Killinger, D., Churnside, J., Rothman, L., 1995. Atmospheric optics. *Handbook of Optics* 1, 44–41.
- Kinzelin, R., 1979. *Guide pratique d'électromyographie dans les lésions des nerfs périphériques*. Maloine, Paris.
- Kohl, M., Lindauer, U., Roysl, G., Kuhl, M., Gold, L., Villringer, A., Dirnagl, U., 2000. Physical model for the spectroscopic analysis of cortical intrinsic optical signals. *Physics in Medecine and Biology* 45 (12), 3749–3764.
- Kuschinski, W., 2000. Regulation of cerebral blood flow, In : *Functionnal MRI*. Springer, New York.
- Lamin, S., Bhattacharya, J., 2003. Vascular anatomy of the spinal cord and cord ischaemia. *British Medical Journal* 3 (2), 92.
- Lawrence, J., Stroman, P.W. and Malisza, K., 2007. Comparaison of functional activity in the rat cervical spinal cord during alpha-chloralose and halotane anesthesia. *NeuroImage* 34, 1665–1672.
- Lawrence, J., Stroman, P., Bascaramurty, S., Jordan, L., Malisza, K., 2004. Correlation of functional activation in the rat spinal cord with neuronal activation detected by immunohistochemistry. *Neuroimage* 22 (4), 1802–1807.

- Leong, S., Tan, C., 1987. Central projection of rat sciatic nerve fibres as revealed by Ricinus communis agglutinin and horseradish peroxidase tracers. *Journal of Anatomy* 154, 15.
- Li, N., Tong, S., Ye, D., Shin, H. and Thakor, N., 2005. Cortical blood flow pattern by laser speckle imaging. *Proceedings of the 2005 IEEE Engineering in medicine and biology 27th annual conference*.
- Li, P., Ni, S., Zhang, L., Zeng, S., Luo, Q., 2006. Imaging cerebral blood flow through the intact rat skull with temporal laser speckle imaging. *Optics Letters* 31 (12), 1824–1826.
- Lloyd, D., 1962. The classification of galvanic skin reflex afferent fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48 (5), 814–817.
- Luo, W., Li, P., Chen, S., Zeng, S., Luo, Q., 2007. Differentiating hemodynamic responses in rat primary somatosensory cortex during non-noxious and noxious electrical stimulation by optical imaging. *Brain Research* 1133 (1), 67–77.
- Magistretti, P., 1999. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences* 354 (1387), 1155–1163.
- Maieron, M., Ianetti, G., Bodurka, J., Tracey, I., Bandettini, P., Porro, C., 2007. Functional responses in the human spinal cord during willed motor actions : evidence for side- and rate- dependant activity. *Journal Neuroscience* 27, 4182–4190.
- Malisza, K., Stroman, P., 2002. Functional imaging of the rat cervical spinal cord. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 16 (5), 553–558.
- Malisza, K., Stroman, P., Turner, A., Gregorash, L., Foniok, T., Wright, A., 2003. Functional MRI of the rat lumbar spinal cord involving painful stimulation and the effect of peripheral joint mobilization. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 18 (2), 152–159.

- Malonek, D., Grinvald, A., 1996. Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy : implications for functional brain mapping. *Science* 272 (5261), 551–554.
- Martin, C., Martindale, J., Berwick, J., Mayhew, J., 2006. Investigating neural–hemodynamic coupling and the hemodynamic response function in the awake rat. *Neuroimage* 32 (1), 33–48.
- Nix, W., Capra, N., Erdmann, W., Halsey, J., 1976. Comparison of vascular reactivity in spinal cord and brain. *Stroke* 7 (6), 560–563.
- Noga, B., Fortier, P., Kriellaars, D., Dai, X., Detillieux, G., Jordan, L., 1995. Field potential mapping of neurons in the lumbar spinal cord activated following stimulation of the mesencephalic locomotor region. *Journal of Neuroscience* 15 (3), 2203.
- Panneton, W., Gan, Q., Juric, R., 2005. The central termination of sensory fibers from nerves to the gastrocnemius muscle of the rat. *Neuroscience* 134 (1), 175–187.
- Quinlan, K., Kiehn, O., 2007. Segmental, Synaptic Actions of Commissural Interneurons in the Mouse Spinal Cord. *Journal of Neuroscience* 27 (24), 6521.
- Richards, G., Briers, J., 1997. Laser speckle contrast analysis (LASCA) : a technique for measuring capillary blood flow using the first order statistics of laser speckle patterns. *Biomedical Applications of Photonics*, 1–6.
- Roy, C., Sherrington, C., 1890. On the regulation of the blood-supply of the brain. *The Journal of Physiology* 11 (1-2), 85.
- Sasaki, S., Sato, K., Shinomiya, K., Momose-Sato, Y., 2003. Postnatal changes in intrinsic optical responses to peripheral nerve stimulation in the in vivo rat spinal cord. *Neuroimage* 20 (4), 2126–2134.
- Sasaki, S., Yazawa, I., Miyakawa, N., Mochida, H., Shinomiya, K., Kamino, K., Momose-Sato, Y., Sato, K., 2002. Optical Imaging of Intrinsic Signals Induced by Peripheral Nerve Stimulation in the in Vivo Rat Spinal Cord. *Neuroimage* 17 (3), 1240–1255.

- Sheffield, S., 2008. Spinal cord anatomy and physiology, Tiré de www.getbodysmart.com.
- Sheth, S., Nemoto, M., Guiou, M., Walker, M., Pouratian, N., Toga, A., 2003. Evaluation of coupling between optical intrinsic signals and neuronal activity in rat somatosensory cortex. *Neuroimage* 19 (3), 884–894.
- Sheth, S., Nemoto, M., Guiou, M., Walker, M., Pouratian, N., Toga, A., 2004. Linear and nonlinear relationships between neuronal activity, oxygen metabolism, and hemodynamic responses. *Neuron* 42 (2), 347–355.
- Smith, W., 2000. Modern optical engineering, Third edition. SPIE press, Mc Graw-Hill, New York.
- Stroman, P., Kornelsen, J., Lawrence, J., Malisza, K., 2005. Functional magnetic resonance imaging based on SEEP contrast : response function and anatomical specificity. *Magnetic Resonance Imaging* 23, 843–850.
- Stroman, P., Ryner, L., 2001. Functional MRI of motor and sensory activation in the human spinal cord. *Magnetic Resonance Imaging* 19, 27–32.
- System, U. M. S., 2008. Spinal Cord injury information network, Tiré de www/spinalcord.iab.edu.
- Tan, Y., Liu, W., Yew, Y., Ong, S., Paul, J., 2004. Speckle image analysis of cortical blood flow and perfusion using temporally derived contrasts. *International Conference in Image Processing*.
- Tomizawa, S., Kawabata, S., Komori, H., Fukuoka, Y., Shinomiya, K., 2008. Evaluation of segmental spinal cord evoked magnetic fields after sciatic nerve stimulation. *Clinical Neurophysiology* 119 (5), 1111–1118.
- Ueki, M., Mies, G., Hossmann, K., 1992. Effect of alpha-chloralose, halothane, pentobarbital and nitrous oxide anesthesia on metabolic coupling in somatosensory cortex of rat. *Acta Anaesthesiol Scand* 36 (4), 318–22.

- Valabrege, R., 2003. Modélisation des relations entre l'activité neuronale et le signal BOLD en IRM. Ph.D. thesis, Université Paris VI Pierre et Marie Curie, UFR des sciences de la vie, Biophysique.
- Villringer, A., 2000. Physiological changes during brain activation. Springer, Berlin.
- Widmaier, E., Raff, H., Strang, K., 2004. Vander, Sherman, & Luciano's human physiology : the mechanisms of body function. McGraw-Hill Higher Education.
- Willis, W., Coggeshall, R., 1991. Sensory mechanisms of the spinal cord, second edition. Plenum Press, New York.
- Yuan, S., Devor, A., Boas, D., Dunn, A., 2005. Determination of optimal exposure time for imaging of blood flow changes with laser speckle contrast imaging. *Applied Optics* 44 (10), 1823–1830.
- Zhao, F., Tai, C., Wang, J., Roppolo, P., Groat, W., Kim, S., 2006. Functional Imaging of the cat spinal cord by CBV-weighted fMRI. In : Proc 14th annual meeting. ISMRM, Seattle, USA, p. 2127.
- Zhao, F., Williams, M., Meng, X., Welsh, D., Coimbra, A., Crown, E., Cook, J., Urban, M., Hargreaves, R., Williams, D., 2007. BOLD and blood volume weighted fMRI of rat lumbar spinal cord during non-noxious electrical hindpaw stimulation (Article in press). *NeuroImage* 40, 133–147.

ANNEXE I**TABLEAUX RÉCAPITULATIFS DES EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES**

Numéro Expérience	Continue / Bloc	Optique / Spectre	Intensité	Zone Imagée	Nerf Stimulé	Profondeur	Résultats	Anesthésiant
R2E1	Bloc	Optique	0.01	Moelle	Tibial	800	[-0.042 -0.035]	Ketamine
R2E2	Bloc	Optique	0.05	Moelle	Tibial	800		Ketamine
R2E3	Bloc	Optique	0.1	Moelle	Tibial	800		Ketamine
R2E4	Bloc	Optique	0.3	Moelle	Tibial	800		Ketamine
R2E5	Bloc	Optique	0.01	Moelle	Péronéal	800		Ketamine
R4								
R4E2	Bloc	Optique	0.02	Moelle	Tibial	800	Résultat moyen cf composante 1	Ketamine
R4E3	Bloc	Optique	0.05	Moelle	Tibial	800	Bons résultats composantes 1 et 2 ACP	Ketamine
R5								
R5E6	Bloc	Optique	0.01	Moelle	Tibial	800	Bons résultats	Ketamine
R5E7	Bloc	Optique	0.03	Moelle	Tibial	800	Bons résultats	Ketamine
R5E8	Bloc	Optique	0.03	Moelle	Tibial	800	Bons résultats	Ketamine
R5E9	Bloc	Optique	0.06	Moelle	Tibial	800	Bons résultats	Ketamine
R5E10	Continue	Optique	0.03	Moelle	Tibial	800	Bons résultats	Ketamine
R5E11	Continue	Optique	0.06	Moelle	Tibial	800	Bons résultats	Ketamine
R5E12	Bloc	Optique	0.03	Moelle	Tibial	800	Bons résultats	Ketamine
R5E13	Bloc	Optique	0.06	Moelle	Tibial	800	Bons résultats	Ketamine
R6								
R6E5	Bloc	Optique	0.01		Péronéal	800	Belle activation sur le cote. ACP comp3	Ketamine
R6E6	Bloc	Optique	0.005		Péronéal	800	Belle activation sur le cote. ACP comp3	Ketamine
R7								
R7E3	Bloc	Optique	0.09	Moelle	Tibial	800	Tres bons malgré mouvement a la stimulation	Ketamine
R7E4	Continue	Optique	0.09	Moelle	Tibial	800	Tres bons malgré mouvement a la stimulation	Ketamine
R7E5	Bloc	Optique	0.03	Moelle	Tibial	1200	Pas de réponse producteur ?	Ketamine
R7E6	Bloc	Optique	0.05	Moelle	Péronéal	1200	Tres localise sur le vaisseau central	Ketamine
R7E7	Continue	Optique	0.06	Moelle	Péronéal	1200	Pas de localisation	Ketamine
R7E8	Bloc	Optique	0.06	Moelle	Péronéal	800	Tres localise sur le vaisseau central	Ketamine
R7E10	Continue	Optique	0.06	Moelle	Péronéal	800	Pas de localisation	Ketamine

FIG. I.1 Tableau récapitulatif des expériences menées d'août à Décembre 2007. Les cases jaunes indiquent les expériences ayant données de bons résultats, les cases rouges celles pour lesquels aucun résultat n'a été obtenu.

Numéro Expérience	Continue / Bloc	Optique / Speckle	Intensité	Zone Imagee	Nerf stimulé	Profondeur	Résultats	Anesthésiant
R8								
R8E1	Bloc	Optique	0.35	Cortex	Tibial	600	Pic temporel a 3.75s. et 8.5s dans deux des composantes	Ketamine
R8E3	Continue	Optique	0.35	Cortex	Tibial	600	Pic a 0.1563Hz. Localisation sur les vaisseaux	Ketamine
R8E4	Continue	Optique	0.35	Cortex	Tibial	1200	Idem	Ketamine
R8E5	Bloc	Optique	0.35	Cortex	Tibial	1200	Reponse a 2.75s. ACP1 sur les vaisseaux, ACP2 OK	Ketamine
R8E6	Bloc	Speckle	0.35	Cortex	Tibial	600	3.5sec. Sur les vaisseaux + zones proches	Ketamine
R8E10	Bloc	Speckle	0.35	Cortex	Vitesse Gauche	600	Aucun	Ketamine
R8E11	Bloc	Speckle	0.35	Cortex	Vitesse Droite	600	Aucun	Ketamine
R9								
R10-11								
R12								
R12E1	Bloc	Optique	0.06	Moelle	Tibial	600	Reponse mais non localisee	Alpha Chloralose
R12E2	Continue	Optique	0.06	Moelle	Tibial	600	Idem	Alpha Chloralose
R12E5	Bloc	Optique	0.15	Moelle	Cortico	600	Reponse non localisee. Normal ?	Alpha Chloralose
R12E6	Continue	Optique	0.15	Moelle	Cortico	600	Beau pic mais reponse sur toute la moelle	Alpha Chloralose
R12E7	Continue	Optique	0.15	Moelle	Cortico	600	Reponse non localisee mais existante	Alpha Chloralose
R12E8	Continue	Optique	0.15	Moelle	Cortico	600	Beau pic mais reponse sur toute la moelle	Alpha Chloralose
R12E9	Bloc	Speckle	0.06	Moelle	Tibial	600	Reponse sur un cote de la moelle mais synchronisation etran	Alpha Chloralose
R13E1	Bloc	Optique	0.05	Moelle	Voies descendantes	600	Mouvements detectes	alpha chloralose
R13E2	Continue 10min	Optique	0.05	Moelle	Voies descendantes	600	Mouvements detectes	alpha chloralose
R13E3	Continue 15min	Optique	0.05	Moelle	Voies descendantes	600	Mouvements detectes	alpha chloralose
R13E4	Bloc	Optique	0.15	Moelle	Voies descendantes	600	Mouvements detectes	alpha chloralose
R13E5	Continue 15min	Optique	0.15	Moelle	Voies descendantes	600	Mouvements detectes	alpha chloralose
R13E7	Bloc	Optique	0.15	Moelle	Voies descendantes	600	Mouvements detectes	alpha chloralose
R13E8	Continue 15 min	Optique	0.15	Moelle	Voies descendantes	600	Mouvements detectes	alpha chloralose
R13E13	Bloc	Optique	0.1	Moelle	Tibial	600	Tres belle reponse. Bonne localisation	alpha chloralose
R13E15	Bloc	Optique	0.15	Moelle	Tibial	600	Tres belle reponse. Bonne localisation	alpha chloralose
R13E22	Aucun	Vitesse Vaisseaux	0	Moelle	0	surface		alpha chloralose

FIG. I.2 Tableau récapitulatif des expériences menées d'août à Décembre 2007. Les cases jaunes indiquent les expériences ayant données de bons résultats, les cases rouges celles pour lesquels aucun résultat n'a été obtenu.

ANNEXE II**TABLEAUX RÉCAPITULATIFS DES EXPÉRIENCES (RATS SAINS ET
LÉSÉS)**

				17-déc	R16		
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Treshold 1ms
Optique	16	Normal	Alpha	?	?	0.06	0.03
	18	Normal	Alpha	?	?	0.09	0.03
	20	Normal	Alpha	?	?	0.03	0.03
				01-févr	R20		
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Treshold 1ms
Optique	3	Normal	Alpha	340	?	0.04	0.02
	4	Normal	Alpha	340	?	0.06	0.02
	5	Normal	Alpha	340	?	0.02	0.02
				05-févr	R21		
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Treshold 1ms
Optique	5	Normal	Alpha	409	2.4	0.09	0.03
	6	Normal	Alpha	410	2.4	0.06	0.03
	8	Normal	Alpha	410	2.4	0.03	0.03
	9	Normal	Alpha	435	2.7	0.12	0.03
Laser	10	Normal	Alpha	396	2.8	0.09	0.03
	11	Normal	Alpha	390	2.7	0.06	0.03
	12	Normal	Alpha	380	2.7	0.03	0.03
	13	Normal	Alpha	375	2.7	0.12	0.03
				08-févr	22		
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Treshold 1ms
Optique	6	Normal	Alpha	405	2.5	0.03	0.03
HbO/HbR	7	Normal	Alpha	394	2.6	0.045	0.03
	8	Normal	Alpha	397	2.8	0.06	0.03
	9	Normal	Alpha	385	2.8	0.09	0.03
Laser	11	Normal	Alpha	330	2.8	0.06	0.03
	12	Normal	Alpha	342	3.3	0.03	0.03
	15	Normal	Alpha	335	3.3	0.045	0.03
	16	Normal	Alpha	340	3	0.09	0.03
				12-févr	23		
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Treshold 1ms
Optique	11	Normal	Alpha	432	3.1	0.06	0.03
	12	Normal	Alpha	434	2.9	0.09	0.03
	13	Normal	Alpha	430	2.8	0.12	0.03
	14	Normal	Alpha	427	2.9	0.03	0.03
				19-févr	24		
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Treshold 1ms
Optique	24	Normal	Alpha	350	2.7	0.03	0.03
	25	Normal	Alpha	325	2.6	0.045	0.03
	26	Normal	Alpha	325	2.5	0.06	0.03
	27	Normal	Alpha	330	2.3	0.09	0.03
	31	Normal	Ketamine	250	3.5	0.03	0.03
	32	Normal	Ketamine	260	3	0.06	0.03
	33	Normal	Ketamine	250	3.1	0.09	0.03
	34	Normal	Ketamine	250	3.1	0.045	0.03

FIG. II.1 Tableau récapitulatif des paramètres physiologiques enregistrés lors des expériences. Les points d'interrogation correspondent à des paramètres non connus.

				22-févr	25			
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Threshold 1ms	
Optique	20	Normal	Alpha	430	4.4	0.03	0.03	
	21	Normal	Alpha	430	3.8	0.045	0.03	
	22	Normal	Alpha	430	3.5	0.06	0.03	
	23	Normal	Alpha	425	3.4	0.09	0.03	
	24	Normal	Alpha	425	3.2	0.03	0.03	
	30	Normal	Ketamine	250	3.5	0.03	0.03	
	31	Normal	Ketamine	260	3	0.06	0.06	
	32	Normal	Ketamine	250	3.1	0.09	0.09	
	33	Normal	Ketamine	250	3.1	0.045	0.045	
				26-févr	26			
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Threshold 1ms	
Optique	4	Normal	Alpha	420	3	0.06	0.03	
	5	Normal	Alpha	400	3	0.03	0.03	
	6	Normal	Alpha	400	3.1	0.045	0.03	
	8	Normal	Alpha	390	3.7	0.09	0.03	
				11-mars	28			
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Threshold 1ms	Threshold 10ms
Optique	22	Lésion	Alpha	384	3.5	0.06	0.028	0.008
	23	Lésion	Alpha	386	3.5	0.03	0.028	0.008
	25	Lésion	Alpha	387	3	0.045	0.028	0.008
	26	Lésion	Alpha	385	3.1	0.09	0.028	0.008
Laser	32	Lésion	Alpha	380	3.3	0.06	0.028	0.008
	33	Lésion	Alpha	385	3.4	0.09	0.028	0.008
	34	Lésion	Alpha	384	4	0.03	0.028	0.008
				25-mars	29			
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Threshold 1ms	Threshold 10ms
Optique	20	Lésion	Alpha	325	0.8	0.22	0.023	0.009
	21	Lésion	Alpha	320	2.7	0.33	0.023	0.009
	22	Lésion	Alpha	320	2.7	0.44	0.023	0.009
	23	Lésion	Alpha	300	2.5	0.66	0.023	0.009
	24	Lésion	Alpha	293	4	0.88	0.023	0.009
Laser	30	Lésion	Alpha	295		0.22	0.023	0.009
	31	Lésion	Alpha	290	2.6	0.33	0.023	0.009
	32	Lésion	Alpha	295	2.7	0.44	0.023	0.009
	33	Lésion	Alpha	300	2.7	0.66	0.023	0.009
	35	Lésion	Alpha	290	3	0.66	0.023	0.009
				01-avr	31			
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Threshold 1ms	Threshold 10ms
Optique	10	Normal	Alpha	455	3.3	0.02	0.048	0.008
	11	Normal	Alpha	453	3.2	0.03	0.048	0.008
	12	Normal	Alpha	450	3.2	0.04	0.048	0.008
	13	Normal	Alpha	450	3.4	0.06	0.048	0.008
	14	Normal	Alpha	445	3.5	0.08	0.048	0.008
	15	Normal	Alpha	413	3.5	0	0.048	0.008
Laser	21	Normal	Alpha	414	3.5	0.02	0.048	0.008
	22	Normal	Alpha	410	3.4	0.04	0.048	0.008
	23	Normal	Alpha	400	3.4	0.06	0.048	0.008
	24	Normal	Alpha	387	3.4	0.08	0.048	0.008
	25	Normal	Alpha	387	3.4	0.08	0.048	0.008
				10-avr	34			
Technique	Expérience	Type	Anesthésie	bpm	Co2	Stim	Threshold 1ms	Threshold 10ms
Optique	21	Lésion	Alpha	318	2.9	0.02	0.023	0.007
	22	Lésion	Alpha	320	3	0.03	0.023	0.007
	23	Lésion	Alpha	315	3.1	0.04	0.023	0.007

FIG. II.2 Tableau récapitulatif des paramètres physiologiques enregistrés lors des expériences. Les points d'interrogation correspondent à des paramètres non connus.

17-déc						
Expérience	Minimum	Temps Minimum	Maximum	Temps Maximum	Normalisation	Expérience
16	-0.0039424	4.651	0.0040702	1.4295	-1	16
18	-0.0051756	4.7852	0.0041916	2.1007	-1.3128	18
20	-0.0011776	4.2483	0.00085361	1.5638	-0.2987	20
01-févr						
Expérience	Minimum	Temps Minimum	Maximum	Temps Maximum	Normalisation	Expérience
3	-0.0086873	4.5168	0.0051591	1.9664	-1	3
4	-0.0097944	4.7852	0.004644	2.1007	-1.1274	4
5	-0.0010575	4.651	0.000300528	1.0268	-0.12173	5
05-févr						
Expérience	Minimum	Temps Minimum	Maximum	Temps Maximum	Normalisation	Expérience
5	-0.014233	3.6667	0.0020953	1.2177	-1.0964	5
6	-0.012981	4.2109	0.0026052	1.898	-1	6
8	-0.0063984	4.2109	-	-	-0.4929	8
9	-0.011274	3.8027	0.0017087	1.4898	-0.8685	9
10	-	-	0.037885	3.3784	2.2625	10
11	-	-	0.017484	3.5946	1	11
12	-	-	-	-	-	12
13	-	-	0.013286	3.91	0.7921	13
08-févr						
Expérience	Minimum	Temps Minimum	Maximum	Temps Maximum	Normalisation	Expérience
6	-0.0016417	4.2727	0.0016417	9.1212	-0.2446	6
7	-0.0057436	4.2727	0.001215	8.9192	-0.81686	7
8	-0.0070312	4.4747	-	-	-1	8
9	-0.003254	4.2727	0.0015337	8.3131	-0.46278	9
11	-	-	0.03549	2.4054	1	11
12	-	-	-	-	-	12
15	-	-	0.031228	2.1892	0.8844	15
16	-	-	0.042549	2.4054	1.2006	16
12-févr						
Expérience	Minimum	Temps Minimum	Maximum	Temps Maximum	Normalisation	Expérience
11	-0.0016756	4.0707	0.00053712	1.4444	-1	11
12	-0.0032189	4	0.00071212	1.6	-1.921	12
13	-0.0027563	4.0707	0.00022072	1.6465	-1.6449	13
14	-0.00043229	4.0707	-	-	-0.25799	14
19-févr						
Expérience	Minimum	Temps Minimum	Maximum	Temps Maximum	Normalisation	Expérience
24	-0.0061596	4.0667	0.0031448	1.4	-0.47863	24
25	-0.011079	4.6	0.0036333	1.9333	-0.86093	25
26	-0.012869	4.7333	0.0052075	1.9333	-1	26
27	-0.016169	4.8667	0.0048285	1.9333	-1.2564	27
22-févr						
Expérience	Minimum	Temps Minimum	Maximum	Temps Maximum	Normalisation	Expérience
20	-	-	-	-	-0.4768	20
21	-0.0015824	4.0667	0.0006225	1.8	-0.81686	21
22	-0.0019372	3.4	-	1.667	-1	22
23	-0.0033663	3.5333	0.002021	1.8	-1.7377	23
24	-	-	-	-	-	24
26-févr						
Expérience	Minimum	Temps Minimum	Maximum	Temps Maximum	Normalisation	Expérience
4	-0.0057648	4.2483	0.0015656	1.5638	-1	4
5	-0.004961	4.7852	0.0015798	1.698	-0.86057	5
6	-0.003744	4.2483	0.001841	1.698	-0.64946	6
8	-0.0023673	3.7718	0.00092697	1.5638	-0.41065	8

FIG. II.3 Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors des expériences.

FIG. II.4 Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors des expériences.