



HAL
open science

Imagerie fonctionnelle par ultrasons de la rétine et des fonctions visuelles cérébrales

Marc Gesnik

► **To cite this version:**

Marc Gesnik. Imagerie fonctionnelle par ultrasons de la rétine et des fonctions visuelles cérébrales. Médecine humaine et pathologie. Université Paris sciences et lettres, 2017. Français. NNT : 2017PSLET011 . tel-02310602

HAL Id: tel-02310602

<https://pastel.hal.science/tel-02310602>

Submitted on 10 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée à l'École supérieure de Physique et de
Chimie Industrielles de la Ville de Paris

Imagerie fonctionnelle par ultrasons de la rétine et des fonctions
visuelles cérébrales

École doctorale n°564

EDPIF – Physique en Ile-de-France

Spécialité Physique

Soutenue par MARC GESNIK
le 15 novembre 2017

Dirigée par **Mickaël TANTER**

COMPOSITION DU JURY :

Mme BOURGEAIS Laurence
Université Paris Descartes, Présidente

M. PRESSNITZER Daniel
Ecole Normale Supérieure, Rapporteur

M. CATHELIN Stefan
Université Claude-Bernard, Rapporteur

M. BENOSMAN Ryad
Université Pierre et Marie Curie,
Examinateur

M. TANTER Mickaël
INSERM, Directeur de thèse

M. DEFFIEUX Thomas
INSERM, Invité

Remerciements

A l'issue de ces trois ans de thèse, je souhaite remercier Mickaël Tanter, pour son accueil dans son équipe formidable puis pour sa direction de thèse. Je remercie Thomas Deffieux, pour son encadrement infatigable et toujours juste. Je remercie également Jean-Luc Gennisson, qui a dirigé la première moitié de ma thèse et avec qui, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

J'exprime toute ma gratitude envers mon jury de thèse, MM. Daniel Pressnitzer et Stefan Catheline qui ont généreusement accepté de rapporter ce manuscrit et M. Ryad Benosman et Mme Laurence Bourgeois qui m'ont fait l'honneur d'être mes examinateurs.

La recherche ne serait rien sans l'argent qu'on veut bien lui accorder. C'est pourquoi, je remercie le *European Research Council* pour les fonds qui m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions à ce projet. Je remercie également l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris (ESPCI Paris) qui fut mon employeur et tutelle au cours de cette thèse.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer en dehors du laboratoire. Tout d'abord, Kévin Blaize de l'Institut de la Vision qui fut mon binôme de travail pendant deux ans et à qui cette thèse doit beaucoup. Je remercie également Serge Picaud, José-Alain Sahel et Mathias Fink pour leur implication dans le projet Helmholtz qui chapote ma thèse. Je remercie également, mes collaborateurs à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Pierre Pouget et Nicolas Wattiez.

Un grand merci à Charlie Demené, Claudia Errico et Elodie Tiran, qui m'ont beaucoup appris sur le fUS. Merci à Franck Lebrin et Jérémy Thalgott pour ce travail commun sur les péricytes.

Egalement un grand merci à toute l'équipe « fUS » : Alexandre Dizeux, pour sa relève précieuse, Jérôme Baranger pour ses bons mots et son génie des Aixplorer, Line pour m'avoir supporté en tête à tête pendant presque deux ans. Bruno, Claire et Laura avec qui on a poussé la Verasonics dans ses derniers retranchements, et Antoine pour son expertise et ses initiatives.

Merci beaucoup à Nathalie pour son aide avec les souris. Hicham et Alexandre pour tous vos bricolages géniaux et surtout à Patricia, sans qui, pas grand-chose ne pourrait se passer au laboratoire.

Un grand merci enfin, à toute l'équipe « médicale », futur PhysMed Paris, et à l'Institut Langevin en général, dans lequel il fait bon vivre et travailler. Un merci tout particulier au bureau R32, qui comme chacun le sait, est mieux que le bureau R31.

Merci aussi à tous les copains PCuns pour ces sept années d'études et de folies que cette thèse vient conclure. J'espère que ça continuera encore longtemps comme ça.

Un immense merci à ma famille pour leurs encouragements et leur soutien au cours de toutes ces années d'études. Merci notamment à ma Maman et à Jean-Luc pour leurs relectures minutieuses des dernières fautes d'orthographe.

Remerciements

Merci enfin à Camille qui partage ma vie et qui me supporte au quotidien à travers toutes mes folies douces, les fous rires et les épreuves.

Résumé

Ces travaux de thèse portent sur les récents progrès de l'imagerie fonctionnelle par ultrasons et ses nouvelles applications en ophtalmologie. Dans le cadre d'un projet commun mêlant physique des ondes, imagerie, neurosciences et ophtalmologie, nous avons montré que cette jeune technologie d'imagerie pouvait être appliquée à l'imagerie du système visuel et à l'étude préclinique de thérapies le ciblant. Au cours de ce projet, nous avons accompagné nos études précliniques de progrès constants dans notre imagerie.

Ainsi, nous avons conçu un dispositif expérimental permettant l'imagerie fonctionnelle par ultrasons en trois dimensions des fonctions visuelles. En utilisant une nouvelle plateforme d'imagerie nous avons montré la possibilité de réaliser cette imagerie en temps réel, ou à une fréquence ultrasonore de 30 MHz en échantillonnant les signaux avec un procédé d'entrelacement. Nous avons également démontré que, grâce à une connaissance a priori de l'architecture vasculaire cérébrale et de l'effet Doppler, il est possible de réaliser une décomposition spectrale des flux et des vaisseaux sanguins cérébraux en fonction de leurs vitesses et de leurs orientations.

Avec tous ces outils nous avons réalisé une étude par imagerie fonctionnelle des fonctions visuelles du rat et du primate non-humain. Nous avons, dans un premier temps, vu que la rétine du primate pouvait aisément être imagée en Doppler de puissance, mais que sa forte mobilité en faisait un organe délicat à imager en imagerie fonctionnelle. En revanche, nous avons pu réaliser une imagerie fonctionnelle de la rétine de rat à 30 MHz. Nous avons ensuite caractérisé en détail le système visuel cérébral de ce rongeur. Nous avons mis en évidence ses principales structures et redémontré leurs caractéristiques les plus connues, comme leur organisation rétinotopique ou leur différence de temps de réponse neurovasculaire à un stimulus. Le même dispositif a ensuite pu être utilisé pour imager l'activité cérébrale d'animaux traités par des thérapies de restauration visuelle. Ces outils ont ensuite permis la première imagerie de primates non-humains anesthésiés puis éveillés et exécutant une tâche comportementale, allant même jusqu'à permettre la détection de variations de flux sanguins dues à des erreurs uniques. Nous avons conclu ces travaux par la conception de protocoles et leurs réalisations pour deux études précliniques de traitements ayant des effets sur la contractilité des vaisseaux sanguins cérébraux dans le but de montrer des variations du flux sanguin à travers une étude aiguë et une étude chronique.

Summary

This thesis focuses on recent improvements in the functional ultrasound imaging (fUS) technique and their applications in the field of ophthalmology. Within the framework of a synergetic project blending waves physics, medical imaging, neuroscience and ophthalmology, fUS was shown to be capable of imaging and studying the visual system of healthy and diseased animals for the purpose of preclinical studies. To tackle these issues, constant upgrades in the fUS technique had to support the preclinical studies.

An experimental set-up was built to image the visual pathway in three dimensions with fUS. Using a new imaging facility, fUS was proven to be feasible in real time and at high ultrasound frequencies such as 30 MHz. Interleaved sampling had to be implemented in that case. Furthermore, the *a priori* knowledge of the vascular cerebral architecture and the Doppler Effect were exploited to spectrally decompose cerebral blood flux and vessels according to their velocities and orientations.

Leveraging these improvements, functional ultrasound imaging of rats and non-human primates was performed. Primate retina was imaged with Power Doppler, but proved to be too mobile to be functionally imaged. However, fUS has been performed on rat retina after 30 MHz fUS imaging had been implemented. The rat visual pathway has then been characterised with fUS. Some of its known features were highlighted such as its retinotopic organisation or the time response differences between some of its structures. The same set-up has been leveraged to map the cerebral activity of animal that underwent visual restoration therapies. These tools were then used to map cerebral activity in anesthetized and awake and behaving monkeys. Unique blood volume variations due to unique mistakes were detected. These tools were finally applied to two preclinical trials on a depressive state of the brain vascular contractility. Blood volume and blood velocity changes were highlighted throughout an acute and a chronic study.

Table des matières

Remerciements	1
Résumé/Summary	3
Table des matières	7
Introduction : La rencontre de la physique et de l'ophtalmologie.....	11
1. Etat de l'Art	13
1.1. Le système visuel	14
1.1.1. L'œil, la rétine et le nerf optique	14
1.1.2. Le chiasma optique et la latéralisation de la vision	16
1.1.3. Les noyaux sous-corticaux.....	16
1.1.4. Le cortex visuel et l'organisation rétinotopique	17
1.2. Deux techniques de restauration visuelle : les implants rétiniens et l'optogénétique	18
1.2.1. Les implants rétiniens.....	18
1.2.2. Thérapie optogénétique	19
1.3. Les techniques d'imagerie fonctionnelle et le couplage neurovasculaire	20
1.3.1. Mesures directes de l'activité cérébrale	20
1.3.2. Le couplage neurovasculaire, un effet de l'activité cérébrale.....	21
1.3.2.1. Architecture vasculaire du cortex.....	21
1.3.2.2. L'Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf)	22
1.3.2.3. Imagerie optique intrinsèque	24
1.3.2.4. Imagerie photoacoustique fonctionnelle	25
1.4. L'imagerie fonctionnelle par Ultrasons (fUS)	26
1.4.1. Principes généraux de l'échographie.....	26
1.4.2. Voir les flux sanguins par ultrasons, le Doppler pulsé	28
1.4.2.1. L'effet Doppler	28
1.4.2.2. Le Doppler impulsionnel	28
1.4.3. Imagerie Ondes Planes et Doppler Ultrarapide	30
1.4.3.1. Imagerie en ondes planes et échographie ultrarapide	30
1.4.3.2. Doppler ultrarapide.....	31
1.4.4. Imagerie fonctionnelle fUS	33
1.4.4.1. Protocole	33
1.4.4.2. Post-Traitement.....	33
1.4.5. Les limites de l'imagerie fUS aujourd'hui.....	35
1.4.5.1. Résolution temporelle	35

1.4.5.2.	Une imagerie 2D uniquement	35
1.5.	Conclusion du chapitre et plan du manuscrit	35
1.6.	Bibliographie.....	36
2.	La rétine et la choroïde imagées par ultrasons fonctionnels.....	41
2.1.	Rappel sur la rétine et résultats attendus	42
2.2.	Imagerie de l'œil de primates non-humains	42
2.2.1.	Matériel et méthodes.....	42
2.2.1.1.	Modèle animal	42
2.2.1.2.	Pilotage de la sonde	43
2.2.1.3.	Séquence d'imagerie fUS	43
2.2.1.4.	Stimulation visuelle.....	44
2.2.2.	Résultats.....	44
2.3.	Imagerie de l'œil du rat	46
2.3.1.	Matériel et méthodes.....	46
2.3.1.1.	Modèle animal et stimuli	46
2.3.1.2.	Imagerie ultrarapide à 30 MHz.....	46
2.3.2.	Résultats.....	48
2.3.3.	Discussion	50
2.3.3.1.	Réponse CBV choroïdienne	50
2.3.3.2.	A propos du mouvement.....	51
2.4.	Conclusion du chapitre et perspectives	51
2.5.	Bibliographie.....	52
3.	Suivre le traitement primaire de l'information visuelle par les ultrasons fonctionnels.....	55
3.1.	Matériel et Méthodes.....	56
3.1.1.	Modèle animal	56
3.1.2.	Stimulation visuelle.....	56
3.1.3.	Séquence fUS	57
3.1.4.	Déplacements motorisés de la sonde et imagerie fUS en 3D.....	58
3.2.	Résultats	58
3.2.1.	Réponse à un stimulus simple dans un plan de coupe coronal	58
3.2.2.	Optimisation du stimulus	59
3.2.2.1.	Influence des paramètres de stimulation	60
3.2.2.2.	Répétabilité de la mesure de fréquence optimale	61
3.2.3.	Explorer le système visuel avec un stimulus simple.....	62
3.2.3.1.	Imagerie fUS en 3D du système visuel.....	62

3.2.3.2.	Mesure de délais de réponse CBV entre les différentes structures	63
3.2.4.	Explorer le système visuel avec des stimuli spatiotemporels complexes	65
3.2.4.1.	Latéralisation et réponse contra-latérale.....	66
3.2.4.2.	Rétinotopie discrète avec un stimulus épisodique	66
3.2.4.3.	Rétinotopie « rapide » et continue avec un stimulus continu.....	67
3.2.5.	Vers une analyse spectrale du fUS	72
3.2.5.1.	Analyse spectrale, vitesses et architecture micro-vasculaire.....	72
3.2.5.2.	Délais de réponse par taille de vaisseau.....	74
3.2.6.	Imagerie fUS et restauration visuelle.....	76
3.2.6.1.	Implants rétiniens	76
3.2.6.2.	Thérapie optogénétique	77
3.3.	Aller plus loin : Explorer la richesse spatiotemporelle du système visuel	79
3.3.1.	Imagerie fUS continue et résolution temporelle	79
3.3.1.1.	Améliorations « software »	79
3.3.1.2.	Un nouvel échographe de recherche	80
3.3.1.3.	Extraire de nouvelles informations	81
3.3.2.	Augmenter la résolution spatiale	81
3.3.3.	Vers une imagerie 3D plus complète	81
3.3.3.1.	Des moteurs rapides pour des plans interdépendants	82
3.3.3.2.	Réseau de transducteurs 2D, Sondes RCA	82
3.3.4.	Mieux prendre en compte la complexité biologique.....	82
3.3.4.1.	Rat éveillé, expérimentation chronique.....	82
3.3.4.2.	Variation le paradigme de stimulation.....	83
3.4.	Conclusion du chapitre	83
3.5.	Bibliographie.....	84
4.	Imagerie fUS de structures impliquées dans des traitements de l'information visuelle haut niveau chez le primate	88
4.1.	Expérimentation animale et primates non-humains	89
4.2.	Imagerie fUS du primate anesthésié.....	89
4.2.1.	Matériel et méthode	89
4.2.1.1.	Modèle animal	89
4.2.1.2.	Stimulation visuelle.....	90
4.2.1.3.	Séquence fUS	90
4.2.2.	Résultats.....	91
4.2.3.	Imager en profondeur	91
4.3.	Imagerie fUS du primate éveillé en protocole de tâche visuelle	93
4.3.1.	Présentation du SEF.....	93

4.3.2.	Matériel et méthode	94
4.3.2.1.	Modèle animal	94
4.3.2.2.	Stimuli – tâche/récompense.....	95
4.3.2.3.	Imagerie fUS	96
4.3.3.	Résultats	96
4.4.	Observer un évènement unique.....	98
4.5.	Conclusion du chapitre et perspectives	100
4.6.	Bibliographie.....	101
5.	Le fUS comme outil de suivi thérapeutique	102
5.1.	Introduction : Les péricytes et le couplage neurovasculaire	103
5.2.	Matériels et Méthodes	104
5.2.1.	Modèles animaux.....	104
5.2.1.1.	Protocole aiguë, avec irradiation	104
5.2.1.2.	Protocole chronique sur souris mutantes	104
5.2.2.	Séquence d'imagerie.....	106
5.2.3.	Séparation des flux	106
5.2.4.	Standardisation du placement et zones d'intérêt.....	107
5.3.	Résultats	109
5.3.1.	Souris irradiées en aiguë.....	109
5.3.1.1.	Augmentation générale du CBV	109
5.3.1.2.	En variant les zones et les estimateurs	110
5.3.2.	Souris saines en chronique	112
5.3.3.	Souris mutantes en chronique.....	113
5.3.3.1.	Effet de la mutation.....	113
5.3.3.2.	Effet des traitements	116
5.4.	Discussion	118
5.5.	Conclusion du chapitre	119
5.6.	Bibliographie.....	119
6.	Conclusion.....	121
	Table des figures	125
	Définitions, abréviations et anglicismes fréquemment utilisés	127
	Publications et congrès.....	128
	Publications dans des revues internationales à comité de lecture	128
	Publications dans des revues de proceedings sans comité de lecture.....	128
	Présentations orales en conférences internationales	128

Introduction : La rencontre de la physique et de l'ophtalmologie

Par le passé, quand la physique a rencontré la médecine, les progrès ont souvent été spectaculaires. Les exemples dans ce sens abondent. Dans le domaine de l'imagerie médicale, les modalités d'imageries les plus célèbres aujourd'hui, comme la radiographie, l'échographie ou l'IRM, sont le fruit de cette rencontre. D'une manière plus confidentielle, mais tout aussi impressionnante, cette rencontre a eu lieu en ophtalmologie vers 1850. Le physicien Hermann Von Helmholtz réutilise alors les outils optiques conçus en astronomie par ses contemporains et conçoit le premier ophtalmoscope en collaboration avec Albrecht von Graef, un des fondateurs de l'ophtalmologie moderne. Cet appareil permet pour la première fois d'éclairer et d'observer l'intérieur de l'œil. Selon Von Graefe, ce nouvel outil révéla « un monde nouveau » aux médecins.

Dans cette optique, le projet SYNERGY HELMHOLTZ, financé par le *European Research Council* (ERC) a vu le jour entre l'Institut Langevin et l'Institut de la Vision. L'interaction entre ces deux laboratoires, l'un spécialiste de physique des ondes et d'imagerie médicale et l'autre spécialiste de l'étude et la thérapie de l'œil devrait, de manière analogue aux interactions entre Helmholtz et Von Graefe, permettre de nouvelles percées en ophtalmologie.

Aujourd'hui avec le vieillissement de la population, on voit croître l'occurrence de troubles visuels comme la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge), le glaucome ou les maladies vasculaires oculaires liées au diabète. Ces maladies peuvent seulement être prévenues ou traitées partiellement. Toutefois, de nouvelles approches thérapeutiques basées sur les prothèses rétiniennes ou la thérapie génique pourraient sauvegarder voire restaurer la vision de ces patients. Ces techniques sont aujourd'hui aux stades de validation préclinique ou même d'essai clinique de phase I, et montrent des résultats prometteurs. Cependant, la validation de ces techniques a besoin d'outils de diagnostic précis qui permettront, d'une part d'orienter les patients vers les bonnes techniques, et d'en quantifier l'efficacité d'autre part.

Un des buts du projet HELMHOLTZ est donc de développer ces outils de diagnostic et de recherche, en se basant sur le savoir-faire en imagerie optique et acoustique de l'Institut Langevin. Ces outils seront destinés à l'imagerie de l'œil et du système visuel au sein du cerveau. Ils devront permettre d'obtenir, à différentes échelles, une cartographie non-invasive, en trois dimensions et en temps réel de ces organes afin de mettre en évidence les mécanismes pathologiques, les biomarqueurs associés et d'être capable de suivre l'avancée des traitements.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre de ce projet sous la bannière de l'imagerie par ultrasons de l'ensemble du système visuel. Parmi les outils d'imagerie développés à l'Institut Langevin, on trouve l'imagerie fonctionnelle par ultrasons (fUS). Cette méthode permet d'imager et mesurer l'activité neuronale via la détection de l'augmentation des flux sanguins concomitante à cette activité. Le but de cette thèse

a donc été d'adapter cette technologie à l'étude préclinique de l'activité neuronale chez des modèles animaux soumis à des stimuli visuels, afin d'en faire un outil pouvant détecter des pathologies visuelles ou de quantifier l'efficacité de techniques de restauration visuelle.

Dans un premier temps, nous présenterons le système visuel et ses constituants. Nous introduirons brièvement ce qu'est l'activité cérébrale et comment la mesurer et l'imager avec les principales méthodes d'imagerie fonctionnelle actuelles. Ceci nous amènera à présenter l'imagerie fonctionnelle par ultrasons. Nous en présenterons les bases physiques et technologiques, ainsi que les divers outils qui ont permis de faire rentrer l'échographie dans le monde des neurosciences.

Dans la suite de ce document, nous suivrons le trajet de l'information visuelle dans le cerveau, de l'œil jusqu'à la prise de décision ; et nous imagerons l'activité neuronale de ces organes par ultrasons fonctionnels. Nous commencerons donc par l'imagerie de l'œil et plus particulièrement de la rétine et de la choroïde qui transforment l'information lumineuse en activité électrique. Ceci nous amènera à développer une méthode d'imagerie haute résolution à 30 MHz.

Après l'œil, nous imagerons ce qu'on pourrait appeler les fonctions visuelles « primaires », à savoir les aires cérébrales qui traitent l'information visuelle au niveau sensoriel. Nous verrons que ces aires sont au nombre de trois : Les Corps Géniculés Latéraux, le Colliculus Supérieur et le Cortex Visuel. Nous introduirons un dispositif d'imagerie fUS qui permet des stimuli visuels riches et variés. Nous explorerons quelques-unes des possibilités offertes par ce dispositif et en ferons varier quelques paramètres afin d'exciter sélectivement le système visuel ou encore de présenter quelques potentiels biomarqueurs neurovasculaires intéressants.

Nous achèverons notre exploration du système visuel par l'imagerie fonctionnelle d'une petite aire corticale du primate impliquée dans la prise de décision et le déclenchement de mouvements oculaires sur la base d'un entraînement et de la présentation d'un stimulus visuel spécifique. Ce sera pour nous l'occasion de montrer la première application de l'imagerie fUS aux primates non-humains éveillés et réalisant une tâche comportementale complexe impliquant le système visuel et les aires préfrontales.

Nous terminerons ce document par une étude préclinique mettant à profit les divers outils développés au cours de cette thèse afin de montrer l'efficacité d'un traitement. Nous verrons les contraintes s'opposant à un suivi chronique de souris au travers de ce traitement et des solutions pour s'en affranchir.

1. Etat de l'Art

Pour l'homme, la vision est un des sens les plus essentiels. Avec l'ouïe, il régit la plupart de nos interactions à distance avec notre environnement et la complexité qui en découle fait du système visuel un objet d'étude ardu et stimulant qui continue de passionner la communauté scientifique. Dans ce chapitre, nous allons présenter ce système, de l'œil jusqu'au cerveau, afin de comprendre son fonctionnement et le chemin de l'information visuelle.

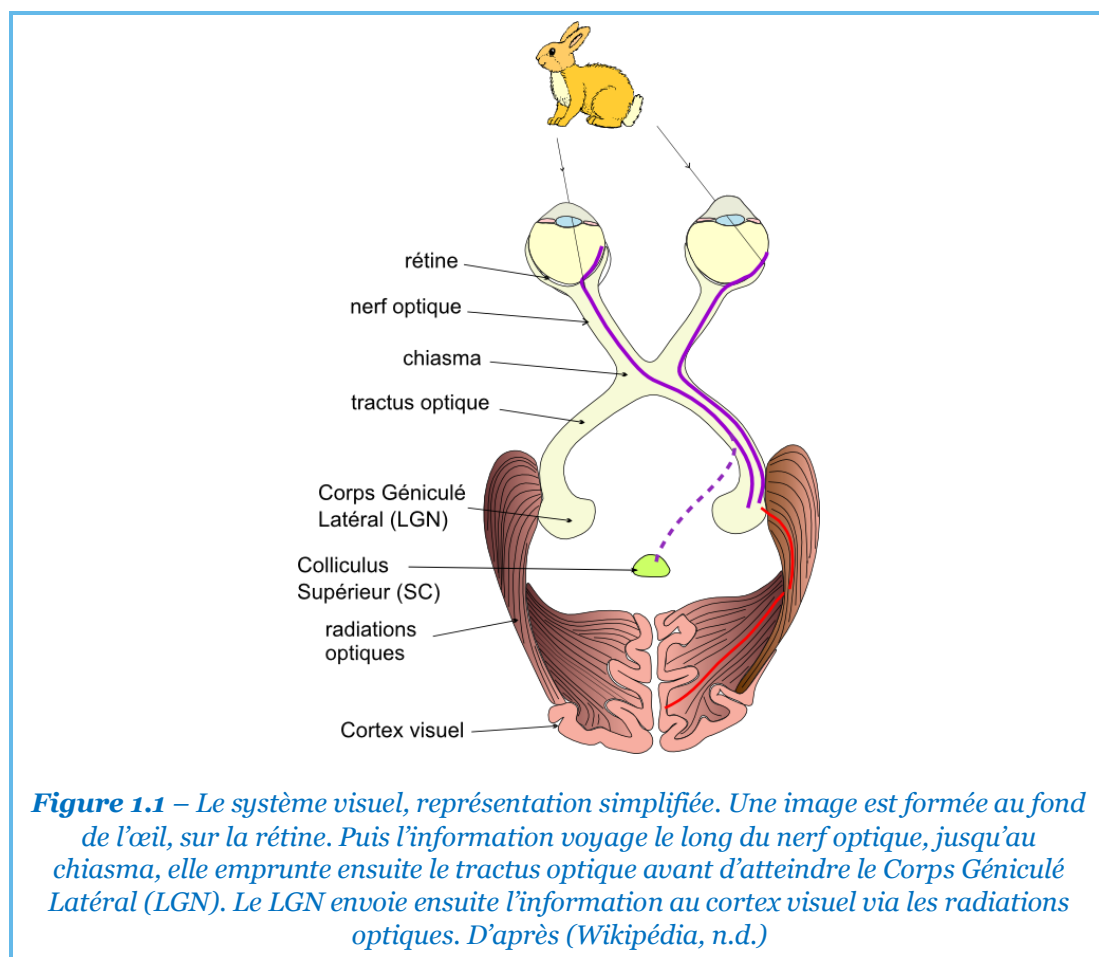
Nous verrons également que, lorsque le cerveau est en activité, on rencontre des variations locales du flux sanguin que nous pouvons chercher à détecter et à imager, afin de révéler ce chemin de l'information et son traitement.

Pour ce faire, nous introduirons l'imagerie fonctionnelle et plus précisément les ultrasons fonctionnels, et expliquerons comment cette méthode basée sur l'imagerie échographique ultrarapide a permis de faire rentrer l'échographie dans le monde des neurosciences, et comment nous espérons en faire un nouvel outil ophtalmologique.

1.1. Le système visuel

Avant toute chose, présentons brièvement le système visuel. La plupart des descriptions et schémas présentés dans cette partie sont tirés de diverses sources et présentations générales. S'il ne fallait en retenir que deux, citons *Wikipédia* ainsi que *The Human Brain : an Introduction to its Functional Anatomy* de John Nolte (Nolte, 2009).

On définit communément le système visuel comme l'ensemble des organes participant à la perception visuelle et qui vont être traversés par l'information visuelle. Le voyage de cette information (**Figure 1.1**) commence par la collecte de la lumière à la surface de la rétine, au fond de l'œil. L'information transite ensuite par le nerf optique jusqu'à différents noyaux sous-corticaux, dont les Corps Géniculés Latéraux (*Lateral Geniculate Nuclei*, LGN), desquels partent les fibres nerveuses qui constituent les radiations optiques qui relient les LGN aux cortex visuels.

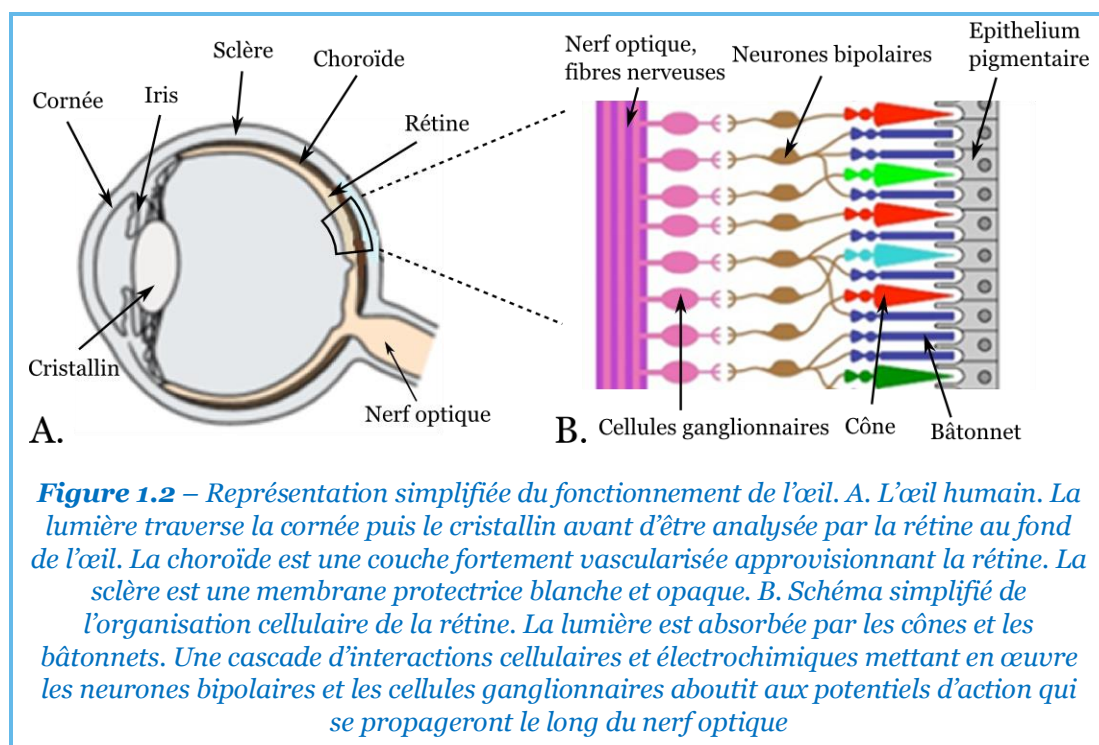


1.1.1. L'œil, la rétine et le nerf optique

L'œil est un des organes les plus complexes du vivant. A travers le règne animal, une multitude de formes et de fonctionnements différents ont été recensés. Ce manuscrit traitant principalement de la vision des mammifères (Primates et rongeurs), on se

limitera à une présentation simple de l'œil de ces derniers et en particulier de l'œil humain. Parmi ses principaux constituants, présentés sur la **Figure 1.2**, on trouve :

- La cornée : transparente, c'est l'entrée de la lumière dans l'œil. Sa courbure permet une première réfraction de la lumière dans l'œil.
- L'iris : une membrane circulaire dont la contraction permet de réguler l'intensité lumineuse pénétrant dans l'œil. L'orifice en son centre est la pupille. Il constitue la partie colorée visible de l'œil.
- Le cristallin : une lentille naturelle déformable. Les muscles ciliaires qui l'entourent, permettent de le déformer pour accommoder, *i.e.* former une image nette sur la rétine.
- La rétine : elle tapisse le fond de l'œil et son rôle est de « récolter » la lumière et de transformer cette information en potentiels d'action qui voyageront le long du nerf optique.
- La choroïde : un dense réseau de vaisseaux sanguins. Elle permet l'approvisionnement en nutriments et oxygène de la rétine.
- La sclère : une membrane protectrice qui entoure la majorité de l'œil. Elle est opaque et constitue ce qu'on appelle le « blanc des yeux ».
- Le nerf optique : connecté à la rétine, il transmet l'information visuelle au cerveau.



La rétine détecte la lumière et exécute le premier traitement de l'information visuelle par l'organisme. Au fond de celle-ci, on trouve les cellules photoréceptrices : les cônes et les bâtonnets. Il existe trois types de cônes, sensibles à trois différentes longueurs d'onde lumineuses. En condition de bonne luminosité ils permettent la vision des couleurs. En cas de faible luminosité, les cônes ne sont plus assez sensibles et ce sont

majoritairement les bâtonnets qui sont utilisés. Comme il n'existe qu'un seul type de bâtonnet, on voit alors seulement en « noir et blanc », comme l'illustre le proverbe « la nuit, tous les chats sont gris ».

Sur la membrane des cellules photoréceptrices, on trouve des protéines très particulières appelées « opsines ». Ces protéines peuvent absorber un photon d'une certaine longueur d'onde et utiliser cette énergie pour ouvrir temporairement un micro-canal permettant à des ions de traverser la membrane cellulaire. Cet échange d'ions déclenche une cascade d'évènements électrochimiques qui se propage ensuite sur la membrane du photorécepteur, puis se poursuit à travers d'autres couches de cellules rétinienne jusqu'à ce qu'un ou plusieurs potentiels d'action soient émis sur le nerf optique, et voyagent ainsi vers la suite du système visuel. On peut remarquer que dans les photorécepteurs, l'information est de nature « analogique » car elle est codée par un incrément du signal électrochimique d'une certaine durée et d'une certaine amplitude liées aux nombres de photons absorbés par le photorécepteur. Alors que sur le nerf optique, l'information est devenue « numérique », codée par des trains de potentiels d'action et par la densité temporelle de ces potentiels d'action au sein de ces trains.

1.1.2. Le chiasma optique et la latéralisation de la vision

A l'endroit du chiasma optique, les deux nerfs optiques se rejoignent et l'information visuelle est redistribuée. En amont du chiasma, les nerfs optiques propagent l'information en provenance de l'œil auquel ils sont attachés. En aval, chaque tractus optique transporte dans son hémisphère cérébral l'information provenant de la moitié du champ visuel contra-latéral. Ainsi, le tractus optique gauche transporte dans l'hémisphère gauche l'information visuelle provenant du champ visuel droit (et vice-versa).

1.1.3. Les noyaux sous-corticaux

Depuis le tractus optique, un faisceau de fibres nerveuses, l'information visuelle poursuit son chemin vers plusieurs noyaux sous-corticaux.

La majorité de ces fibres aboutit aux Corps Géniculés Latéraux (ou Corps Genouillés Latéraux, *Lateral Geniculate Nuclei*, LGN). Les LGN sont des relais synaptiques qui procèdent à un prétraitement de l'information visuelle avant d'envoyer celle-ci aux cortex visuels. Chez les primates, il existe une organisation fonctionnelle en six couches des LGN, certaines plus sensibles aux formes et aux couleurs, tandis que d'autres le sont plus aux mouvements et aux contrastes.

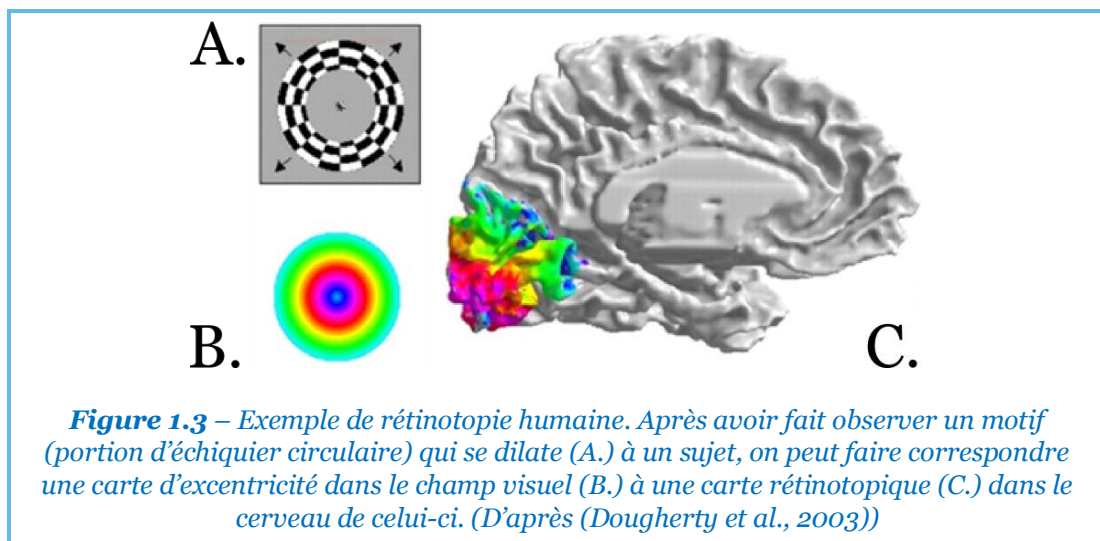
Le Colliculus Supérieur (SC) et l'Aire Prétéctale voisine sont deux autres noyaux sous-corticaux desservis par les tractus optiques. L'importance des fibres y aboutissant varie selon les vertébrés. On trouve par exemple plus de fibres aboutissant aux LGN qu'au Colliculus Supérieur chez les primates. La fonction du Colliculus Supérieur n'est pas encore bien comprise aujourd'hui. On pense cependant qu'il joue un rôle dans certains réflexes comme les mouvements des yeux ou de la tête visant à suivre certains stimuli

visuels. Il serait responsable de certaines sensations visuelles inconscientes observées chez des personnes aveugles à cause de lésions du cortex visuel.

D'autres noyaux sont desservis par les tractus optiques, mais ils présentent peu d'intérêt pour le présent manuscrit. Citons, à titre de curiosité, le noyau suprachiasmatique, intervenant dans le rythme circadien (le fait que certains processus biologiques suivent une oscillation d'environ 24h).

1.1.4. Le cortex visuel et l'organisation rétinotopique

Les LGN sont reliés aux cortex visuels par les radiations optiques. L'organisation des fibres visuelles depuis la rétine et le nerf optique, jusqu'à leur aboutissement dans le cortex visuel, induit une organisation rétinotopique de celui-ci. *I.e.* deux points voisins, distincts, du champ visuel, sont traités par deux points voisins, distincts de la surface du cortex visuel (Mathématiquement, on peut dire qu'il existe une projection entre le champ visuel et le cortex visuel, on parle d'*homéomorphisme*). La **Figure 1.3** montre un exemple de rétinotopie humaine expérimentale. Ici, Dougherty et ses collaborateurs montrent que le centre du champ visuel (bleu clair, puis rose) est traité à l'extrémité occipitale du cerveau, puis plus l'information provient de la périphérie du champ de vision, plus son traitement s'éloigne de cette extrémité occipitale.



Parce que cette organisation apparaît dès le nerf optique (et ses connections sur la rétine), on trouve aussi une organisation rétinotopique dans tous les principaux noyaux sous-corticaux présents le long du chemin de l'information visuelle, notamment dans les LGN et le Colliculus Supérieur.

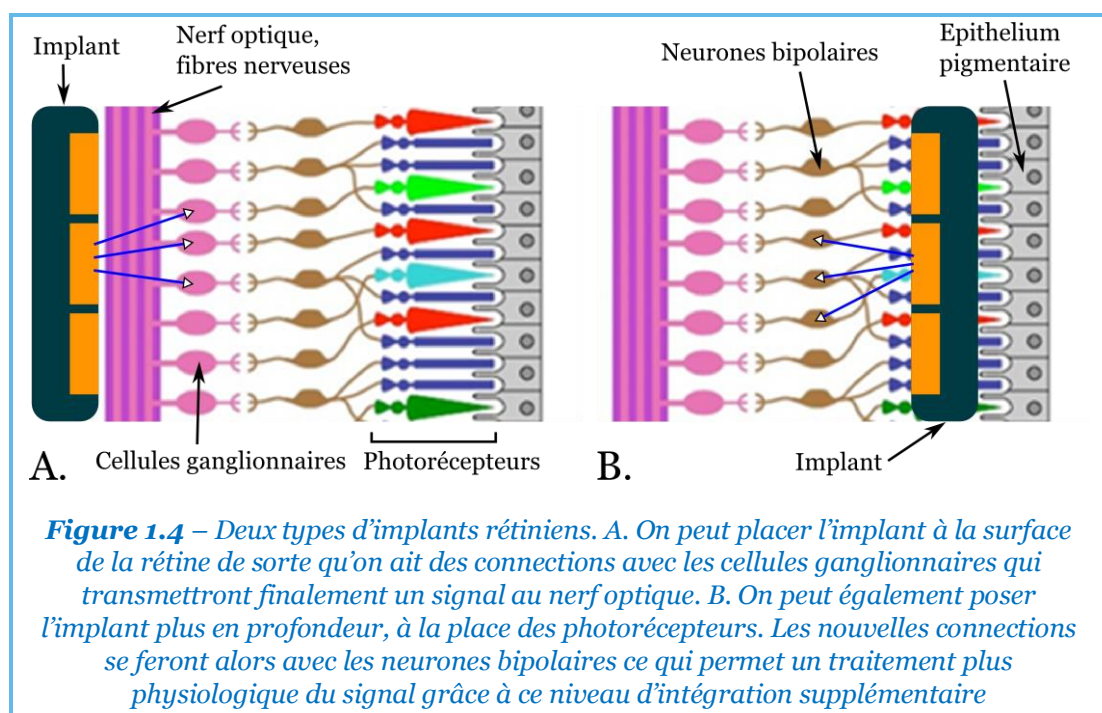
1.2. Deux techniques de restauration visuelle : les implants rétiniens et l'optogénétique

Un des buts à long terme de notre projet est d'utiliser les techniques d'imagerie que nous développons pour évaluer l'efficacité de deux techniques de restauration visuelle : la pose d'implants rétiniens et l'optogénétique. Ces deux techniques ciblent les cas de cécités dues à un dysfonctionnement de la rétine.

1.2.1. Les implants rétiniens

Le principe des implants rétiniens est simple. Puisque la rétine n'est plus capable de transformer l'information lumineuse qu'elle reçoit en potentiels d'action sur le nerf optique, on implante un dispositif photosensible, capable de stimuler les cellules de la rétine encore vivantes aux endroits où il reçoit de la lumière (**Figure 1.4**). Ces implants sont généralement constitués de petites électrodes photoélectriques (Chuang et al., 2014; Lorach et al., 2015; Zehnder and Tiedtke, 2008). Il existe différents dispositifs, adaptés aux différentes pathologies. On peut citer, à titre d'exemple :

- L'implant épi-rétinien : Placé à la surface de la rétine, il communique avec les couches cellulaires les plus superficielles comme les cellules ganglionnaires. La chirurgie est simple mais l'implant doit envoyer des signaux électriques assez forts.
- L'implant sous-rétinien : Placé dans la rétine en remplacement partiel de la couche photoréceptrice, il communique avec les cellules plus profondes de la rétine. Ce qui permet de profiter plus pleinement de la chaîne d'intégration du signal visuel le long des couches de cellules de la rétine.



Ces techniques sont en cours de test sur l'homme et montrent des résultats spectaculaires de patients aveugles retrouvant une certaine perception visuelle et rendus ainsi capables d'attraper des objets, de se déplacer sans tâtonner, voire de reconnaître certains visages (Humayun et al., 2013; NIH, 2017; Pixium Vision SA, 2017). Toutefois, le mécanisme exact de restauration visuelle chez ces patients grâce à leur plasticité cérébrale reste mal compris. En comprenant ce mécanisme, des restaurations visuelles plus performantes pourraient être conçues.

1.2.2. Thérapie optogénétique

L'optogénétique est un jeune domaine de recherche en neurosciences alliant optique et génétique dont la principale particularité est de rendre des neurones photosensibles (Deisseroth et al., 2006; Herlitze and Landmesser, 2007).

Grâce à un procédé tiré du génie génétique, on fait en sorte que certains neurones produisent des opsines sur leurs membranes. Grâce à ces protéines membranaires capables d'échanges d'ions avec l'extérieur du neurone lorsqu'elles absorbent un photon (voir 1.1.1 et (Zhang et al., 2011)), un tel neurone peut émettre des potentiels d'action lorsqu'il est illuminé. Ce qui donne aux chercheurs de nouvelles façons d'explorer le système nerveux. On peut, par exemple, rendre des neurones moteurs photosensibles et observer les changements de motricité lorsque ces neurones sont sollicités par des impulsions lumineuses.

On a également vu que les photorécepteurs sont capables, grâce à leurs opsines, de transformer l'information lumineuse en information électrique. Dans certains cas de cécités les photorécepteurs dysfonctionnent, tandis que le reste des cellules rétiniennes fonctionne encore correctement. On peut alors utiliser l'optogénétique pour convertir ces cellules neuronales, encore saines mais normalement insensibles à la lumière, en photorécepteurs artificiels dans le but de restaurer partiellement la vision (Duebel et al., 2015). Cette technique est donc prometteuse. Toutefois, contrairement aux implants rétiniens, cette technologie n'est pas encore expérimentée sur l'homme. En revanche, elle ne nécessite qu'une simple injection, et non la pose potentiellement risquée d'un implant. En outre toute la rétine pourrait être traitée par optogénétique, ce qui n'est pas possible dans le cas des implants.

Dans le cadre de ce projet, le procédé utilisé consiste à transfecter les cellules ganglionnaires de la rétine de rats à l'aide d'un virus, injecté en intravitreal. Ces cellules expriment alors un gène codant pour la protéine ChrimsonR-tdTomato (ChR-tdT) qui les rend sensibles aux photons de longueur d'onde 590 nm (Douar et al., 2016; Macé et al., 2015; Sengupta et al., 2016; Vandenberghe and Auricchio, 2012).

1.3. Les techniques d'imagerie fonctionnelle et le couplage neurovasculaire

Après avoir décrit le système visuel, attachons-nous maintenant à décrire les outils qui nous en permettront l'étude. Dans la suite de ce manuscrit, il va donc être question d'explorer le système visuel. En neurosciences, une façon simple d'explorer comment une tâche est pilotée par le cerveau est d'exécuter cette tâche et de mesurer l'activité cérébrale lors de l'exécution. Les aires cérébrales dont l'activité augmente de façon corrélée, participent au pilotage de la tâche.

Comme nous allons le voir, l'activité du cerveau peut être étudiée à différentes échelles par différents moyens.

1.3.1. Mesures directes de l'activité cérébrale

Revenons à ce qu'on appelle communément « l'activité cérébrale ». Cette activité a lieu originellement dans les neurones, qui s'échangent des signaux électriques qu'on appelle les potentiels d'action. Un potentiel d'action est un signal électrique de quelques dizaines de millivolts d'amplitude, se propageant sur la membrane des neurones, et dû à des échanges locaux d'ions. Dès lors, pour mesurer l'activité cérébrale, on peut mesurer directement ces potentiels d'action, *i.e.* effectuer une mesure électrique ou de la concentration des ions impliqués.

On mesure aujourd'hui l'activité électrique, de deux manières :

- Localement, par électrophysiologie. On amène une fine électrode au contact d'un neurone ou au voisinage de plusieurs neurones et on mesure la tension ou le courant électrique local. On peut ainsi accéder directement à chaque potentiel d'action d'un neurone unique (*Single-unit recording*) ou à la contribution des neurones contenus dans un volume d'une taille caractéristique d'une centaine de μm (*Local Field Potential* ou LFP). Cette méthode, très ancienne, très précise et très résolue temporellement, reste encore aujourd'hui la mesure de référence pour l'activité cérébrale (Galvani, 1791; Scanziani and Häusser, 2009). Elle est cependant invasive *in vivo* puisqu'elle nécessite d'introduire l'électrode dans le cerveau jusqu'à la zone d'intérêt.
- Globalement, par électroencéphalographie (EEG) de surface (Niedermeyer and Lopes Da Silva, 2005) ou par magnétoencéphalographie (MEG) (Hämäläinen et al., 1993). On colle sur le scalp des électrodes sensibles aux très faibles variations du champ électrique (quelques μV) ou magnétique (quelques fT) induites par l'ensemble de l'activité cérébrale. Ces méthodes permettent aujourd'hui de déterminer avec une excellente résolution temporelle (moins d'une milliseconde) et de manière non-invasive la survenue d'évènements neuronaux. En revanche, leur résolution spatiale de l'ordre du centimètre en raison de la complexité des problèmes inverses mis en jeu et des longueurs d'ondes des phénomènes impliqués, en fait des modalités d'imagerie difficiles d'utilisation (Baillet et al., 2001).

Pour mesurer l'activité neuronale via les échanges d'ions, on va utiliser l'imagerie calcique. On cherche à détecter les variations locales de concentration en ions calcium, grâce à des molécules qui fluorescent après chélation du calcium. Ces molécules peuvent être injectées (Denk et al., 1990) ou bien directement produites *in situ* par les neurones après manipulation génétique (techniques optogénétiques) (Tian et al., 2009). En observant le cerveau au microscope, on visualise directement et avec une bonne résolution temporelle, l'activation de neurones individuels. Cependant, cette technique est réservée aux cas où on peut avoir un accès optique aux neurones avec un microscope, *i.e.* observer la surface du cortex après craniotomie, sur quelques millimètres carrés ou implanter une sonde optique en profondeur mais toujours avec un champ de vue extrêmement restreint.

Ainsi, ces techniques de mesures directes de l'activité cérébrale offrent d'excellentes précisions temporelles permettant par exemple de mesurer la vitesse de la réponse neuronale (Bruyins-Haylett et al., 2010; Saul and Feidler, 2002), mais leurs principes de fonctionnement impliquent nécessairement une étude à l'échelle microscopique et ne permettent donc pas d'imager les processus de la vision dans la totalité du cerveau.

1.3.2. Le couplage neurovasculaire, un effet de l'activité cérébrale

Plutôt que de mesurer l'activité des neurones, on peut mesurer les conséquences de cette activité.

1.3.2.1. Architecture vasculaire du cortex

On estime que notre cerveau consomme environ 20% de notre énergie, alors qu'il ne représente que 2% de notre poids total. En effet, pour maintenir leur activité, les neurones consomment beaucoup d'énergie, sous forme de nutriments et d'oxygène apportés par le sang, via le très dense réseau vasculaire qui parcourt le cerveau. Ainsi, pour alimenter ses neurones, le cortex est approvisionné en sang par des artérioles qui y pénètrent en profondeur puis qui deviennent de fins capillaires au fil des embranchements. Enfin, le sang est évacué par des veinules qui remontent en surface (**Figure 1.5A**).

De plus, Roy et Sherrington (Roy and Sherrington, 1890) ont constaté en 1890 que « *le cerveau possède un mécanisme interne permettant des variations locales des flux vasculaires en correspondance avec des variations locales d'activité fonctionnelle* ». Ainsi, par un phénomène appelé « hyperémie » ou « couplage neurovasculaire » le cerveau est capable de modifier localement la dynamique du sang, en réponse à une activation neuronale (**Figure 1.5B**). Nous reviendrons sur un mécanisme cellulaire mis en jeu dans ce couplage à la fin de ce manuscrit (voir 5.1). Détecter ces changements locaux permet indirectement de cartographier les zones activées. En effet, bien que ce phénomène soit relativement lent (de l'ordre de deux secondes (Martindale et al., 2003)), il reste suffisamment localisé (Hillman et al., 2007; Sheth et al., 2004) pour autoriser une imagerie précise des fonctions cérébrales.

Parmi les paramètres affectés par le couplage neurovasculaire, on compte la vitesse du sang (*Cerebral Blood Flow*, CBF), le volume de sang (*Cerebral Blood Volume*, CBV) ou

encore le taux d'oxygénation du sang et de l'hémoglobine. Ainsi, de nombreuses techniques visent à mesurer les variations de ces grandeurs pour inférer l'activité cérébrale à différentes échelles spatiales ou temporelles. Arrêtons-nous sur trois techniques d'imagerie fréquemment utilisées en neurosciences aujourd'hui pour cartographier les fonctions cérébrales.

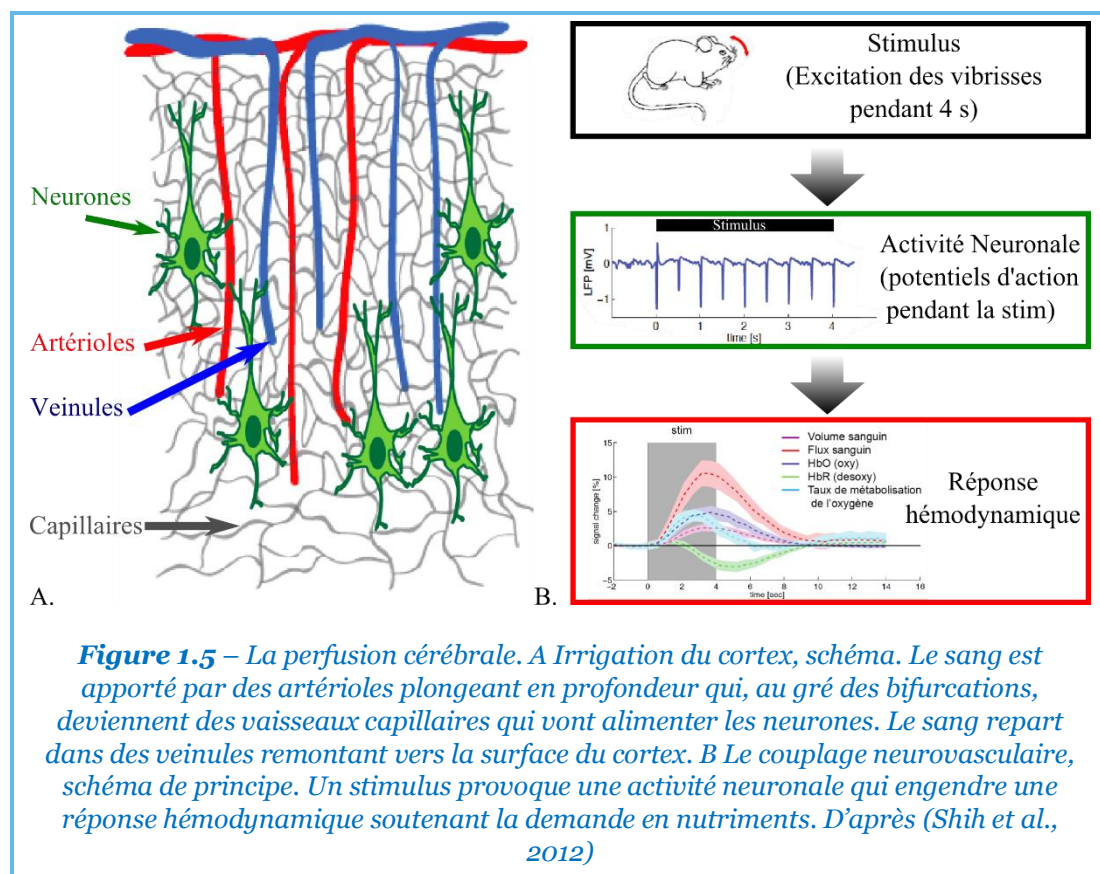


Figure 1.5 – La perfusion cérébrale. A Irrigation du cortex, schéma. Le sang est apporté par des artérioles plongeant en profondeur qui, au gré des bifurcations, deviennent des vaisseaux capillaires qui vont alimenter les neurones. Le sang repart dans des veinules remontant vers la surface du cortex. B Le couplage neurovasculaire, schéma de principe. Un stimulus provoque une activité neuronale qui engendre une réponse hémodynamique soutenue par la demande en nutriments. D'après (Shih et al., 2012)

1.3.2.2. L'Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf)

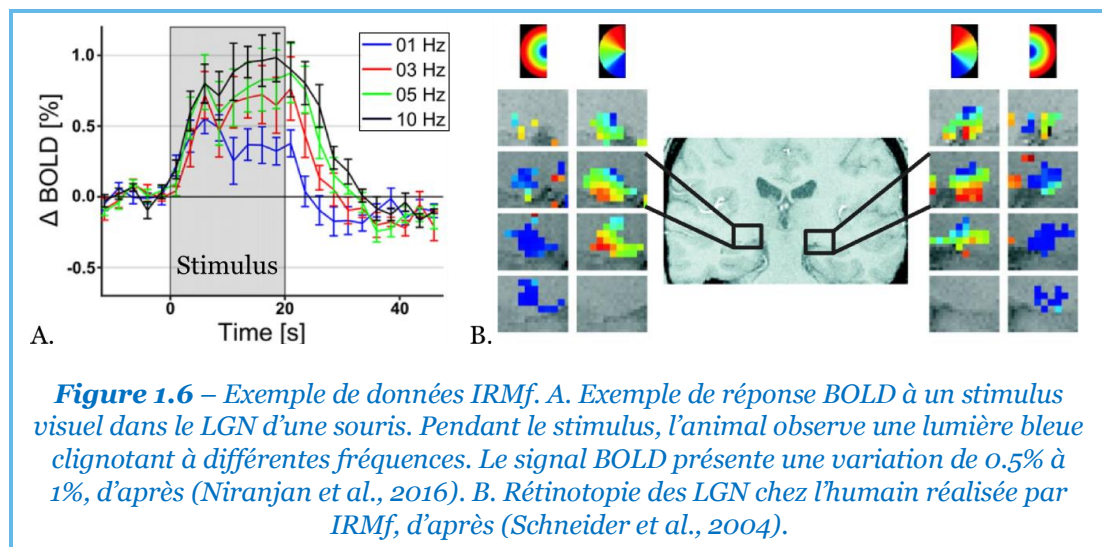
C'est, depuis 25 ans (Ogawa et al., 1990), l'imagerie de référence en neurosciences. Non invasive, non ionisante et capable de fournir des données en trois dimensions du cerveau entier, elle permet d'étudier directement le cerveau humain en fonctionnement.

L'IRMf est basée sur la mesure des variations du signal BOLD (*Blood Oxygen Level Dependent*). Ce signal est relatif à la concentration d'hémoglobine désoxygénée dans le sang (notée HbR). En effet, la HbR est paramagnétique, contrairement à l'hémoglobine oxygénée (notée HbO) qui est diamagnétique. Ce paramagnétisme modifie localement la susceptibilité magnétique du sang, à laquelle l'IRM est sensible. Or une des manifestations du couplage neurovasculaire, est une variation locale du rapport des concentrations de HbO et HbR à cause de la consommation en oxygène croissante des neurones. Bref, l'activité cérébrale induit une variation locale du signal BOLD de l'ordre de quelques pourcents (Buxton et al., 1998). Détecter ces variations

et les localiser précisément dans le cerveau permet une imagerie fonctionnelle du cerveau : l'IRMf.

Les neurosciences ont beaucoup profité de l'invention de l'IRMf. Ainsi, cette technique permet l'exploration du système visuel dans son intégralité (voir **Figure 1.3** et **Figure 1.6**). Toutefois l'IRMf souffre de limitations qui s'avèrent rédhibitoires dans certains cas.

Comme on peut le voir sur la **Figure 1.6A**, les variations du signal BOLD sont parfois inférieures à 1%. Pour observer de si faibles signaux et en fonction de la précision souhaitée, il est souvent nécessaire de répéter les stimuli, afin de moyennner les signaux sur plusieurs essais du même stimulus, voire sur plusieurs sessions expérimentales sur plusieurs sujets. En outre, si les résolutions spatiale (inférieure au millimètre) et temporelle (un volume par seconde) de l'IRMf sont tout à fait honorables, elles ne permettent pas toujours d'observer facilement la dynamique temporelle de la réponse BOLD ou l'étude de très petites structures chez le petit animal.



La nature de l'IRMf impose également un environnement contraignant. Les très forts champs magnétiques (de 1T en clinique à 14T, voire plus, en recherche) mis en œuvre, interdisent la présence d'objets contenant des matériaux ferromagnétiques. Ce qui interdit, entre autres, la présence dans l'IRM de fer, nickel ou cobalt et de tous leurs dérivés. Ainsi, les implants rétiniens décrits en 1.2.1 ne sont pas compatibles avec l'environnement IRM. Une autre technique d'imagerie est nécessaire pour imager les sujets implantés. Une autre contrainte forte liée à l'IRMf est qu'il est nécessaire que le cerveau du sujet soit immobile au centre de l'appareil. Ce qui empêche l'étude de sujets en mouvement (en plus d'être inconfortable lors de longues séquences expérimentales).

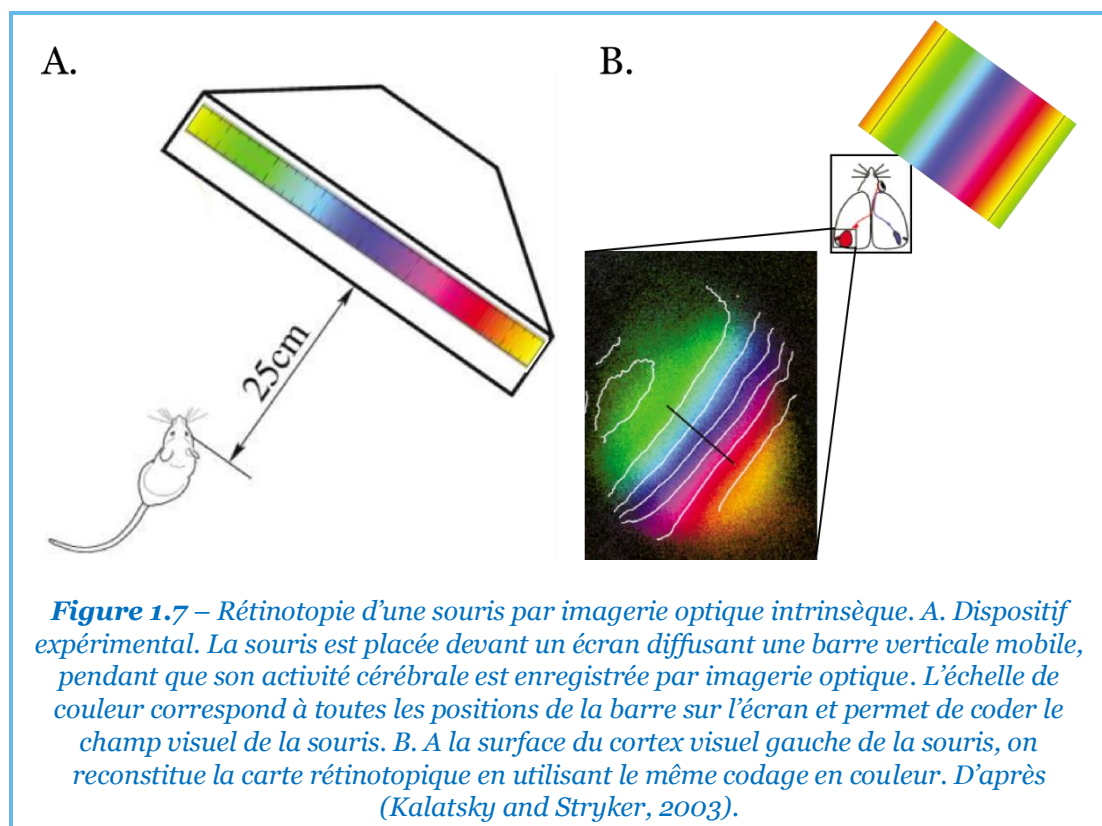
Enfin, l'IRM reste une modalité d'imagerie encombrante et très coûteuse. Car au coût d'achat de l'appareil, il faut ajouter des coûts de fonctionnement, de maintenance et d'entretien importants.

1.3.2.3. Imagerie optique intrinsèque

On a dit précédemment que, suite au couplage neurovasculaire, on observait un afflux sanguin après une activation neuronale. Ainsi, on peut, tout naturellement, filmer le sang dans le cerveau pour localiser ces activations. C'est à peu près ce que proposent les techniques d'imagerie optique intrinsèque (Frostig et al., 1990; Grinvald et al., 1986).

En pratique, après craniotomie, on éclaire la surface du cerveau avec une lumière rouge ou proche infra-rouge et on récupère le signal rétrodiffusé par le cerveau grâce à un objectif de microscope et une caméra CCD. Sur chaque pixel de la caméra, l'intensité de ce signal dépend, en première approximation, de la réflectivité locale du tissu cérébral qui, à ces longueurs d'onde, diminue lorsque la quantité d'hématies (proportionnelle au volume local de sang, CBV) augmente. Ainsi, le signal d'un pixel contenant une zone vascularisée diminue en cas d'afflux sanguin.

Ainsi, cette méthode bénéficie d'une excellente résolution spatiale, dépendant du nombre de pixels et de l'ouverture de l'objectif utilisé, et est *in fine* limitée par la diffraction de la lumière. Elle peut donc être inférieure au micromètre. Un bon taux de rafraîchissement de la caméra CCD permet facilement d'avoir plusieurs dizaines à centaines d'images par seconde. On peut ainsi réaliser des analyses spatio-temporelles précises des fonctions cérébrales à la surface du cerveau comme la rétinitopie présentée en **Figure 1.7** (on reviendra plus précisément sur ce procédé au cours du Chapitre 3).



Toutefois, si cette méthode profite des avantages des méthodes optiques, elle en possède aussi le principal inconvénient : une faible profondeur d'imagerie. En effet, à cause de la diffusion multiple de la lumière, au-delà de quelques micromètres de profondeur, il devient très complexe de réaliser une image. Cette méthode est donc réservée aux mesures en surface du cerveau avec craniotomie.

1.3.2.4. *Imagerie photoacoustique fonctionnelle*

Il est délicat d'imager la vascularisation du cerveau en profondeur en utilisant une méthode optique. En revanche, la photoacoustique, une modalité d'imagerie récente et originale qui mélange lumière et ultrasons, offre des perspectives intéressantes (Beard, 2011). Comme on l'a dit plus haut, lorsque la lumière se propage dans les tissus biologiques, elle est multiples fois diffusée après quelques micromètres de profondeur. Passée cette profondeur, il est donc délicat de former une image de la vascularisation. En revanche, la lumière n'est complètement absorbée qu'après quelques centimètres dans les tissus. L'imagerie photoacoustique tire profit de cette faible absorption.

Pour réaliser cette imagerie, on tire une impulsion lumineuse (généralement avec un laser rouge ou proche infra-rouge) sur les tissus. La lumière y pénètre et est multiples fois diffusée. Sur son chemin, elle rencontre diverses structures plus ou moins absorbantes. Or, lorsqu'un objet absorbe la lumière, il chauffe et se dilate. Cette variation, brève et locale, de température et de volume aboutit à la propagation d'une onde de pression, ayant pour origine les structures absorbantes. Cette onde acoustique se propage alors dans le tissu jusqu'à un réseau de transducteurs acoustiques qu'on aura placés à la surface pour enregistrer ce signal. En première approximation, la propagation de la lumière et son absorption se font infiniment plus vite que la propagation du son dans les tissus. Donc en synchronisant la source lumineuse et l'enregistrement de l'onde acoustique, on peut remonter aux sources acoustiques par formation de voies et ainsi avoir une image des tissus avec leur absorption pour contraste. Par ailleurs, aux longueurs d'onde rouge et proche infra-rouge, le principal absorbeur dans les tissus est l'hémoglobine. On réalise donc une image de la vascularisation en profondeur, dont la résolution est celle des ondes acoustiques utilisées.

Ainsi, on peut suivre le flux de sang cérébral (ou *Cerebral Blood Flow*, CBF) par photoacoustique et faire de l'imagerie fonctionnelle (Wang et al., 2003).

A l'instar de ce qu'on a vu sur l'IRMf, les variations d'oxygénation de l'hémoglobine ont également une influence sur son absorption optique. Ainsi, l'imagerie photoacoustique fonctionnelle permet d'imager simultanément les variations de flux sanguin et les variations d'oxygénation du sang, inhérentes au couplage neurovasculaire (Yao et al., 2015).

Puisqu'elle permet une imagerie fonctionnelle en profondeur basée sur l'imagerie des vaisseaux sanguins cérébraux, cette technique est très prometteuse. Néanmoins, la nécessité de coupler un dispositif de détection acoustique à une source laser rend les dispositifs assez complexes.

1.4. L'imagerie fonctionnelle par Ultrasons (fUS)

Intéressons-nous maintenant à la technique d'imagerie qui fut le cœur de ce travail de thèse : l'imagerie fonctionnelle par ultrasons.

1.4.1. Principes généraux de l'échographie

Une échographie est une image de l'échogénicité ultrasonore d'un milieu, *i.e.* de la propension des tissus à renvoyer des échos ultrasonores lorsqu'ils sont insonifiés.

La théorie de la propagation des ondes et la célèbre loi de Snell-Descartes, nous apprennent que lorsqu'une onde se propage dans un milieu homogène, et qu'elle rencontre une interface avec un autre milieu, une partie de cette onde est transmise dans le second milieu, tandis qu'une autre partie est réfléchiée dans le premier. Pour réaliser une échographie, on émet donc des ultrasons dans le corps, et la réception des signaux réfléchis permet de construire une image des interfaces responsables de ces échos, bref une image des structures des tissus. Sur la **Figure 1.8**, on distingue nettement les parois de l'artère carotide tandis que le sang, très homogène et peu échogène par rapport aux structures avoisinantes, apparaît sombre.

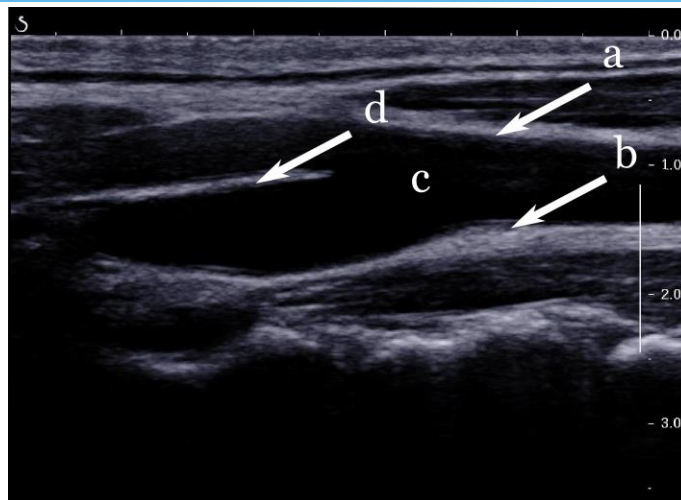
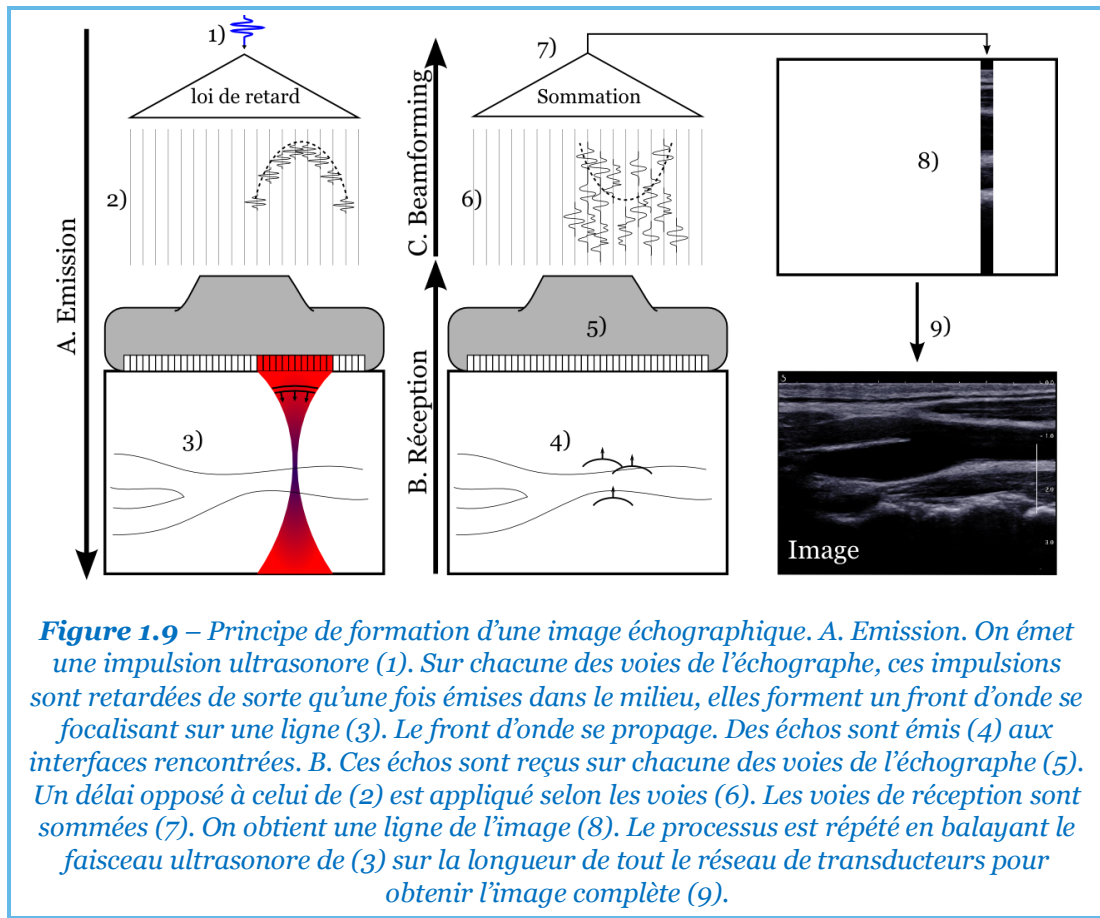


Figure 1.8 – Exemple d'image échographique. Bifurcation de l'artère carotide. Les parois de l'artère (a et b) forment une interface claire entre le sang (c) et les tissus extérieurs. On peut aussi remarquer le tissu formant la bifurcation (d)

Intéressons-nous maintenant à la façon dont on forme ce type d'image (**Figure 1.9**). Pour réaliser une échographie, on appose une sonde à la surface du corps. Cette sonde comporte un réseau de 128 à 256 transducteurs ultrasonores, indépendants, reliés à autant de voies électroniques de l'échographe, chacun capable d'émettre et de recevoir des ultrasons. Lors de la phase d'émission, on veut émettre une impulsion ultrasonore sur une ligne (ici, ce serait plutôt une colonne) en face d'un seul de ces transducteurs. Pour ce faire, cette impulsion est émise par un groupe de transducteurs avec différents délais. De sorte que, en se propageant, le front d'onde ainsi émis va se focaliser en face

du transducteur central. Grâce à cette focalisation numérique en émission, seul un mince pinceau est insonifié.

Au cours de sa propagation, le front d'onde rencontre divers réflecteurs et diffuseurs acoustiques qui vont renvoyer autant d'échos acoustiques depuis la zone insonifiée. Ces échos sont ensuite captés par les transducteurs de la sonde. On applique ensuite une loi de retard inverse de celle appliquée à l'émission à tous ces signaux avant de les sommer. Cette dernière étape de focalisation numérique en réception, aussi appelée « formation de voies » (ou *beamforming* en anglais) permet d'obtenir la ligne de l'image acoustique en face de l'élément central de la séquence d'émission-réception. Pour former l'image complète, on répète l'opération, ligne par ligne, *i.e.*, en face de chacun des transducteurs qui constituent la sonde.



Ainsi pour former une seule ligne de l'image, il faut attendre le temps d'aller-retour des ultrasons dans notre milieu. Ainsi pour une profondeur d'imagerie de 5 cm et une vitesse typique des ultrasons dans les tissus de 1500 m/s, il faut environ 67 μ s pour former une ligne, donc 8 ms pour former une image de 128 voies. Ce qui autorise une cadence d'imagerie avoisinant les 120 images par seconde. On peut donc imager confortablement les tissus en temps réel par échographie. C'est à cette caractéristique qu'on doit certains succès de l'imagerie ultrasonore, notamment dans les domaines où le mouvement des tissus est permanent (cardiologie et obstétrique notamment).

La résolution de ces images est inversement proportionnelle à la fréquence des ultrasons utilisés. Ainsi, en clinique, pour des organes profonds, on utilise classiquement des fréquences entre 1 MHz et 5 MHz. Ce qui donne des résolutions d'imagerie entre 1 mm et 0,2 mm. Pour des applications d'imagerie superficielle ainsi qu'en imagerie du petit animal, on préfère utiliser des fréquences plus hautes de 15 MHz à 30 MHz pour des résolutions d'environ 100 μm et 50 μm .

Remarquons que les images ainsi obtenues, portent une information essentiellement structurelle. Tel quel, nous avons peu d'informations sur les écoulements vasculaires. Il va donc falloir approfondir encore la technique pour en faire une imagerie fonctionnelle.

1.4.2. Voir les flux sanguins par ultrasons, le Doppler pulsé

Voyons maintenant comment il est possible de détecter ou d'imager les flux sanguins.

Si l'échogénicité du sang est faible, elle n'est cependant pas nulle. En effet, les multiples constituants microscopiques du sang (hématies, globules blancs, plaquettes) sont autant de petits réflecteurs acoustiques. De plus, à la différence des tissus, ces réflecteurs sont en mouvement par rapport à la sonde échographique. On tire parti de ce mouvement pour mesurer les flux sanguins.

1.4.2.1. L'effet Doppler

L'effet Doppler est un phénomène bien connu en acoustique, observé lorsqu'un émetteur s'éloigne ou se rapproche d'un récepteur.

Considérons un réflecteur acoustique en mouvement vers la sonde, avec une vitesse axiale v_z . Si la sonde focalise une émission acoustique continue à la fréquence f_0 sur ce réflecteur, alors, après réflexion, le signal reçu par la sonde a une fréquence $f_0 + f_d$. Où f_d est appelée fréquence Doppler et vaut :

$$f_d = -\frac{2v_z f_0}{c} \quad (1.1)$$

Où c est la vitesse du son dans le milieu. Ainsi, c et f_0 étant connues, mesurer f_d permet d'estimer v_z . Cependant, le caractère continu de l'émission acoustique nécessaire à cette mesure impose une mesure ponctuelle qui n'est pas compatible avec les applications d'imagerie que nous recherchons ici.

1.4.2.2. Le Doppler impulsionnel

L'échographie utilise des impulsions ultrasonores. Voyons comment en tirer parti pour mesurer les vitesses des diffuseurs dans toute la zone imagée.

Considérons un tissu traversé de vaisseaux sanguins sur lequel on fait deux tirs successifs et focalisés d'impulsions ultrasonores. Le signal rétrodiffusé provenant du tissu sera identique car on peut considérer que le tissu et ses structures échogènes sont

immobiles. En revanche, le signal provenant du sang sera différent d'un tir à l'autre car les hématies sont emportées par l'écoulement entre temps. Dès lors, on peut montrer que dans un écoulement sanguin, le temps de décorrélation t_d entre deux images est l'inverse de la fréquence Doppler définie en (1.1), i.e. $f_d = 1/t_d$. Ainsi, le signal provenant d'une telle zone fluctue à la fréquence f_d et en répétant les tirs ultrasonores dans cette zone, on peut échantillonner puis filtrer ces fluctuations et en déduire des informations sur l'écoulement. Il faut cependant respecter le critère de Shannon et s'assurer que la fréquence de répétition des tirs ultrasonores f_{acq} respecte $f_{acq} > 2 f_d$.

Ainsi pour les écoulements sanguins les plus rapides, comme ceux de la carotide pouvant atteindre 1 m/s et usuellement imagés avec des sondes centrées à $f_0 = 8$ MHz, il faut maintenir des cadences de tirs de l'ordre de 10 kHz. En revanche pour les flux cérébraux dont il sera question dans ce manuscrit, imagés à 15 MHz et dont les vitesses varient entre 1 mm/s et 20 mm/s (Shih et al., 2009), des cadences de tirs entre 500 Hz et 1 kHz sont suffisantes.

Les mêmes théories de traitement du signal nous apprennent aussi que si la fréquence d'échantillonnage fixe la fréquence maximale mesurable, le nombre d'échantillons et donc, le temps d'acquisition fixent la précision avec laquelle ces fréquences sont mesurées. Avec cette notion de nombres d'échantillons utilisés pour la mesure de la vitesse, arrive un compromis bien connu en imagerie focalisée et illustré sur la **Figure 1.10**. Il est possible de mesurer très proprement le flux sanguin en un point en y répétant les tirs ultrasonores mais la mesure reste ponctuelle. On peut réaliser une imagerie en exécutant quelques tirs (une dizaine en général) sur une ligne puis scanner la zone d'imagerie en y déplaçant le faisceau. La mesure de vitesse est alors moins précise mais permet cette fois-ci une cartographie.

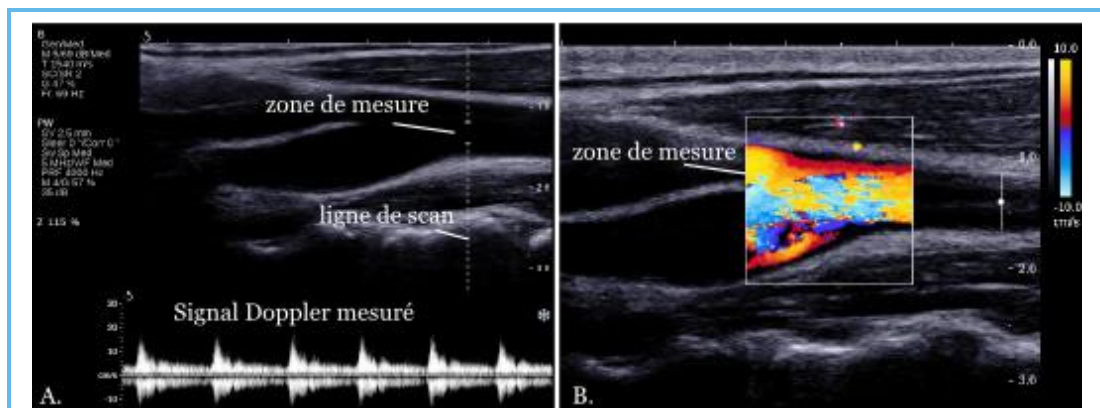


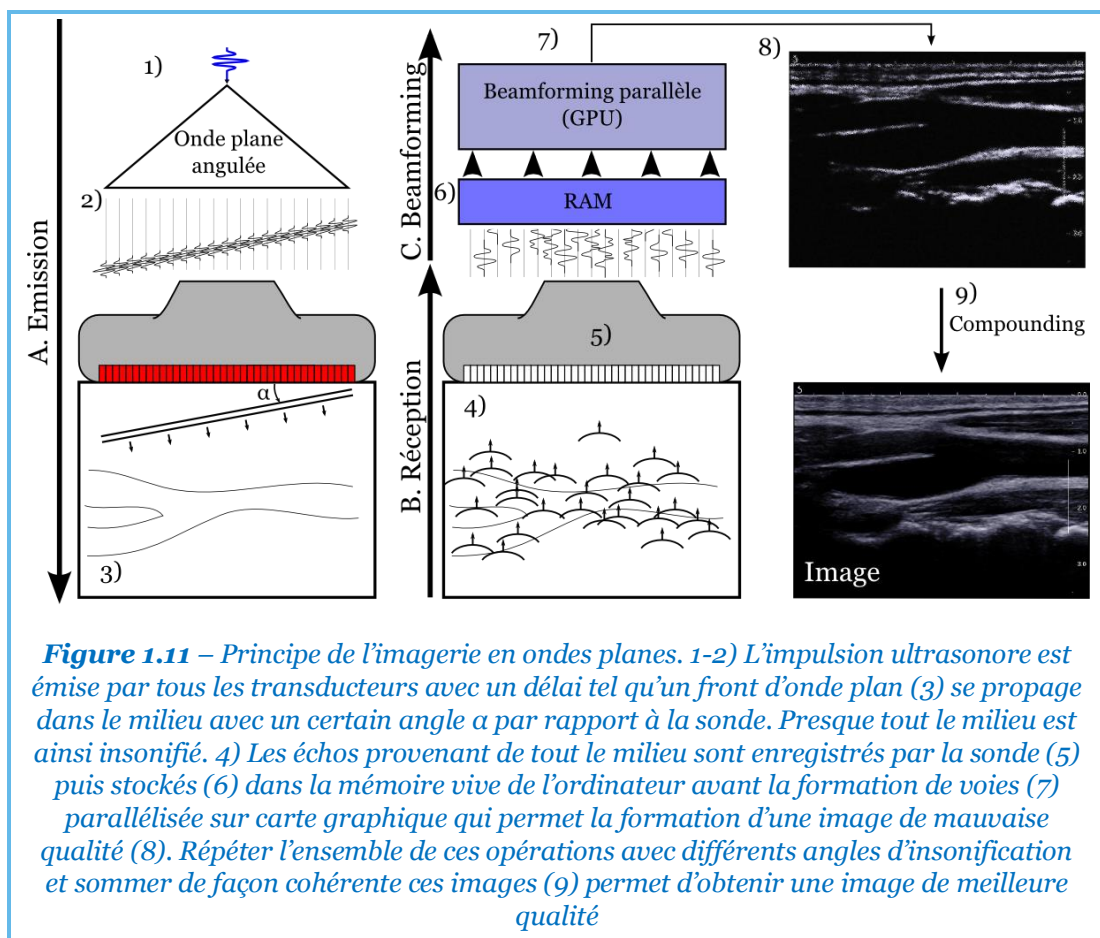
Figure 1.10 – Illustration des deux techniques de Doppler conventionnelles sur l'artère carotide. A. Doppler « Pulsé ». On répète les tirs focalisés au même endroit sur la même ligne (en pointillés). Au point de mesure, on obtient un signal propre et adapté aux mesures quantitatives. B. Pour avoir une image des flux, on réalise un Doppler « Couleur ». On focalise les ultrasons sur une ligne de la zone de mesure, on réalise une dizaine de tirs pour y estimer la vitesse et on passe à la ligne suivante pour scanner la zone de mesure. Les vitesses obtenues de la sorte ont surtout une valeur qualitative et morphologique.

1.4.3. Imagerie Ondes Planes et Doppler Ultrarapide

En profitant de la révolution numérique, l'imagerie parallèle en ondes planes a révolutionné l'échographie. Expliquons ses principes fondateurs et voyons ce qu'ils apportent à l'imagerie des flux sanguins.

1.4.3.1. Imagerie en ondes planes et échographie ultrarapide

La **Figure 1.11** résume le principe de cette imagerie. Lors de l'émission de l'impulsion, les délais appliqués sur les différentes voies ne servent plus à focaliser les ultrasons mais à émettre une onde plane inclinée d'un certain angle α par rapport à la sonde. Tout le milieu est ainsi insonifié en une seule émission. Les échos rétro-propagés sont captés par la sonde puis les signaux des différentes voies sont envoyés dans la mémoire vive d'un ordinateur qui procède ensuite à la formation de voies numérique parallélisée sur une puissante carte graphique. Puisque l'émission n'est pas focalisée, l'image en résultante est de faible qualité. En revanche, une unique séquence d'émission-réception a suffi à la former. Ce qui augmente sensiblement les cadences d'imagerie accessibles.



On peut augmenter la qualité des images obtenues en formant d'autres images avec des angles d'émission différents. La sommation cohérente (*compound* en anglais) des

différentes images permet de retrouver une qualité d'imagerie équivalente à celle de l'imagerie conventionnelle (Montaldo et al., 2009; Tanter et al., 2002). En jouant sur le nombre d'ondes planes utilisées pour construire une image on peut obtenir différents compromis entre qualité et haute cadence d'imagerie.

Ainsi pour les cas de cadences très élevées on peut atteindre des cadences jusqu'à 10 000 à 40 000 images par secondes suivant les profondeurs. Ce qui lui vaut le nom « d'échographie ultrarapide ».

Cette nouvelle façon d'imager les tissus a d'abord été pensée pour suivre la propagation d'ondes de cisaillement dans les tissus (Sandrin et al., 2002, 1999) mais permet aujourd'hui de repenser d'autres modalités d'imagerie ultrasonores comme l'imagerie de flux sanguins.

1.4.3.2. Doppler ultrarapide

1.4.3.2.1. Principe

Nous expliquions en 1.4.2.2 que, en imagerie Doppler conventionnelle, pour pouvoir scanner toute une zone d'imagerie, il est nécessaire de balayer le faisceau ultrasonore dans toute cette zone. Ce qui impose un faible nombre d'échantillons temporels par position dans l'image et donc une faible sensibilité aux flux sanguins. Et que, à l'inverse, pour avoir un signal Doppler de bonne qualité, il faut répéter les impulsions ultrasonores en un seul point.

L'imagerie en onde plane permet de s'affranchir de ce compromis. Puisque tout le milieu est insonifié à chaque impulsion, tout se passe comme si on était capable de focaliser les ultrasons en chaque point de l'image pour chaque tir. Ainsi on peut mesurer les flux sanguins en tout point de l'image avec une qualité de signaux Doppler proche de celle des signaux obtenus en mode Doppler Pulsé (**Figure 1.12**).

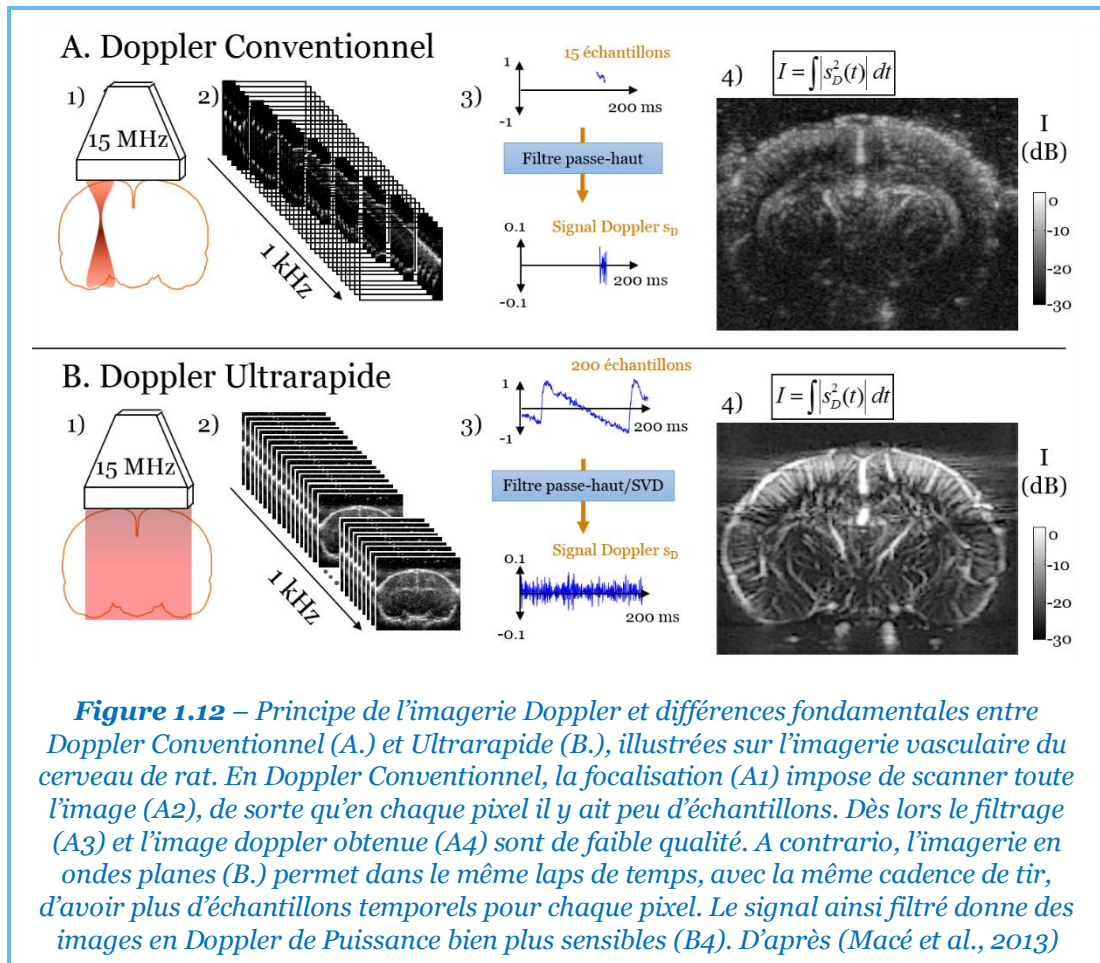
1.4.3.2.2. Filtrage

Nous expliquions en 1.4.2.2 que dans une image ultrasonore, le signal provenant du sang est mélangé à celui provenant du tissu. Pour séparer ces deux contributions au sein d'un pixel, nous avons expliqué que le signal sanguin fluctue à la fréquence Doppler, f_d , tandis que le signal tissulaire fluctue peu. Dès lors, un filtrage passe-haut permet de séparer ces deux composantes au sein d'un même pixel. Toutefois cette approche a deux inconvénients :

- Si le tissu bouge (à cause de mouvements de l'opérateur, respiratoires ou cardiaques), la contribution tissulaire du signal échographique va aussi fluctuer à une fréquence non nulle pouvant potentiellement polluer les fréquences Doppler
- Si on veut observer de très petits flux (comme ceux des capillaires cérébraux), les fréquences Doppler tendant vers zéro sont délicates à séparer des contributions tissulaires

Pour pallier à cela, un filtre spatio-temporel basé sur la décomposition en valeurs singulières (SVD) a récemment été mis au point (Demené et al., 2015a). Ce filtre utilise

le constat que le signal tissulaire et le signal vasculaire n'ont pas la même cohérence spatiale et sont décorrélés. En cas de mouvement tissulaire, la majorité de l'image va être affectée et tous les pixels de l'image vont fluctuer, tandis que les flux sanguins vont varier de plus petits groupes de pixels. De plus, le signal tissulaire a une plus grande amplitude. La décomposition en valeurs singulières permet de représenter la succession d'images échographiques dans une base de vecteurs propres non-corrélés. Dans cette nouvelle base, les vecteurs propres représentant les contributions tissulaires sont attachés à des valeurs propres (énergies) plus élevées. Ce qui permet de séparer les signaux des tissus et des vaisseaux par un simple seuillage.



1.4.3.2.1. Doppler de Puissance

Une fois la contribution des flux sanguins séparée de celle des tissus, différentes métriques peuvent être obtenues et représentées sur l'image. Sur la **Figure 1.10** c'est la vitesse axiale du sang qui est représentée. Pour l'imagerie fonctionnelle (et la **Figure 1.12**), nous préférons réaliser une imagerie en Doppler de Puissance (*Power Doppler*). Il a été montré que cette métrique est plus sensible pour les petits vaisseaux et peu sensible à l'aliasing (Macé et al., 2013; Rubin et al., 1994). Ainsi à chaque pixel de signal s_D échantillonné n fois aux temps T_i on attribue une intensité I définie par :

$$I = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |s_D(T_i)|^2 \quad (1.2)$$

Dans le cas de l'imagerie cérébrale, on souhaite s'affranchir de l'influence des battements cardiaques. Pour ce faire, on va sommer dans la formule (1.2) le signal s_D sur un temps égal à un ou deux battements cardiaques (Osmanski et al., 2014b), soit 200 à 400 ms chez le rat. La valeur obtenue pour chaque pixel est alors proportionnelle au Volume Sanguin Cérébral (CBV) ayant traversé ce pixel pendant le temps d'acquisition.

On a maintenant une méthode capable de cartographier le CBV et de suivre son évolution au cours du temps avec un pas temporel de 400 ms. Ce qui est suffisant pour suivre les variations locales du CBV dues au couplage neurovasculaire. En somme, cette méthode va nous permettre de faire de l'imagerie fonctionnelle.

1.4.4. Imagerie fonctionnelle fUS

Pour réaliser une imagerie fonctionnelle par ultrasons (fUS), il faut parvenir à détecter et à localiser les changements de CBV induits par des stimuli. Illustrons la méthode sur le cas simple de la stimulation électrique du nerf sciatique d'un rat (Osmanski et al., 2014b) et résumé sur la **Figure 1.13**.

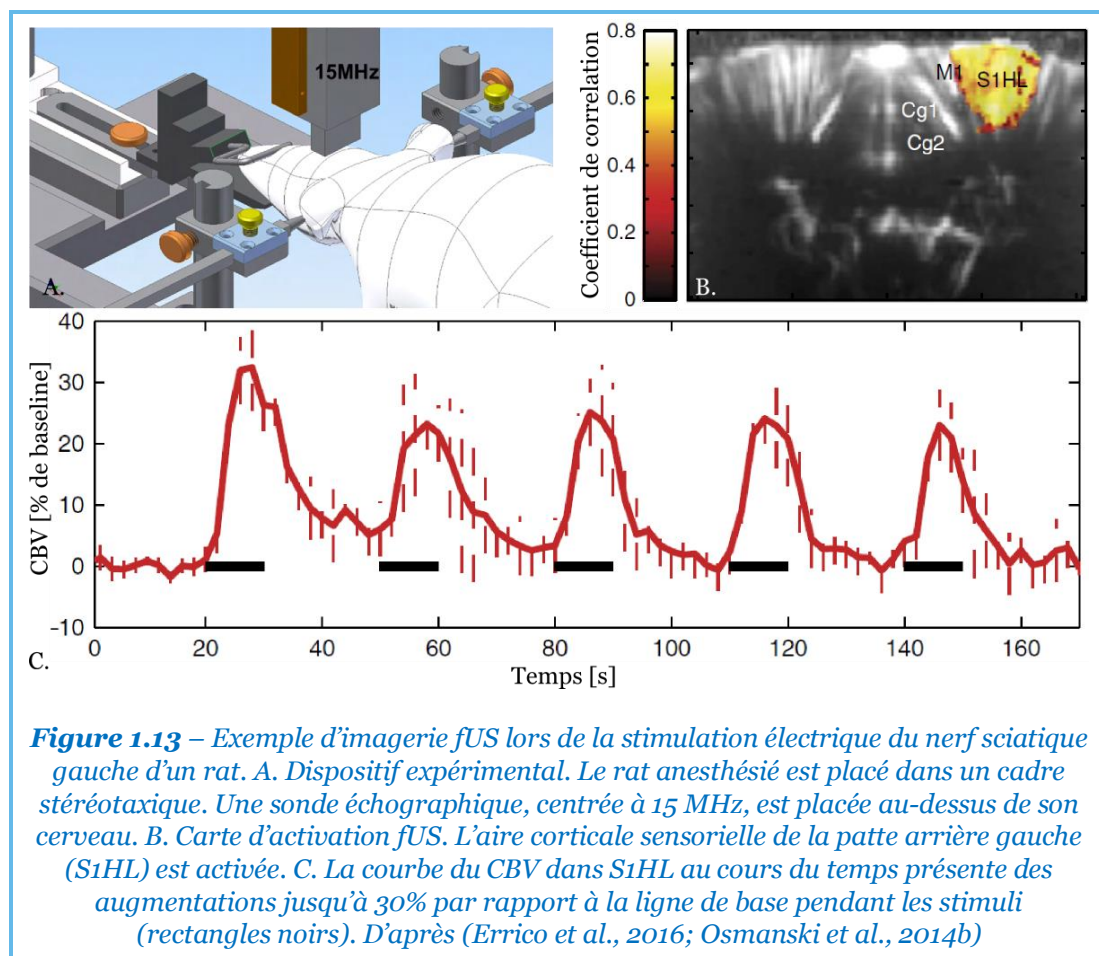
1.4.4.1. Protocole

On commence par anesthésier l'animal, puis on réalise une craniotomie. En effet, le crâne est un fort aberrateur et atténuateur pour les ultrasons. Cette opération permet dans un premier temps de maximiser les signaux reçus (des méthodes moins invasives permettant de garder l'animal éveillé ou avec un crâne intact ont été développées, nous reviendrons dessus au cours de ce manuscrit (Errico et al., 2016; Sieu et al., 2015; Tiran et al., 2017)). On dépose un gel couplant sur le cerveau, puis une sonde échographique centrée à 15 MHz est placée au-dessus du cerveau. Une longue séquence d'imagerie en ondes planes est ensuite exécutée de manière à produire une image CBV toutes les 2 s à 400 ms, réalisant un film du CBV, et contenant son évolution spatiotemporelle. Pendant l'exécution de la séquence, on réalise le stimulus. Dans notre cas, on va stimuler le nerf sciatique du rat plusieurs fois en laissant des périodes de repos. Par exemple, après 20 s de repos, on stimule le nerf pendant 10 s et on répète l'opération cinq fois.

1.4.4.2. Post-Traitement

La carte d'activation est réalisée en post-traitement. Chaque pixel du film CBV est analysé indépendamment. Si ce pixel se trouve dans une zone cérébrale activée par le stimulus, son profil temporel présentera des augmentations pendant les périodes de stimulus, entrecoupées de retour à la ligne de base pendant les périodes de repos, bref,

un profil semblable à un créneau (**Figure 1.13C**). *A contrario*, un pixel se trouvant dans une zone cérébrale non activée par le stimulus ne présentera pas ce profil.



L'outil mathématique permettant naturellement de discriminer ces deux types de pixels est donc la corrélation. On inter-corrèle le profil temporel de chaque pixel avec un créneau dont les niveaux bas représentent les périodes de repos et les niveaux hauts, celles de stimulation. Le pixel se voit ensuite attribuer la valeur du maximum d'inter-corrélation (ou la valeur de la corrélation à délai nul, *i.e.* au sens de Pearson, suivant les cas). On obtient ainsi une carte de corrélation. Les pixels proches de 1 faisant apparaître les zones activées parmi les pixels proches de 0 des zones restées inactives.

On procède ensuite à une opération de seuillage afin de ne garder que les pixels jugés significativement corrélés au stimulus. Le seuil utilisé est généralement égal à un certain nombre de fois l'écart-type du bruit de corrélation, mesuré dans une zone de l'image dont on est certain qu'elle ne présente pas d'activation et est donc représentative du bruit.

Ainsi le fUS permet de cartographier les fonctions cérébrales dans le plan d'imagerie défini par la sonde ultrasonore. Aujourd'hui, elle a aussi été utilisée pour étudier d'autres stimuli sensoriels, certains assez courants en neurosciences comme ceux des vibrisses (Macé et al., 2011), et d'autres moins courants comme les stimuli olfactifs (Osmanski et al., 2014a). Les récents développements permettant d'étudier la fonction

cérébrale d'animaux éveillés et mobiles (Sieu et al., 2015) sont également très prometteurs.

1.4.5. Les limites de l'imagerie fUS aujourd'hui

Malgré ces promesses, il reste encore quelques limitations aux ultrasons fonctionnels. Au cours de ce manuscrit, nous avons tâché de répondre à deux d'entre elles présentées ci-dessous.

1.4.5.1. *Résolution temporelle*

En 1.4.4.1, nous expliquions que notre méthode produit une image CBV toutes les 2 s. Cela peut sembler paradoxal après qu'on ait expliqué en 1.4.3.1 que l'imagerie en ondes planes permet des cadences d'imagerie de plus de 10 000 images échographiques par seconde. Cette réduction de cadence a deux causes principales :

- Il faut s'affranchir de l'influence des battements cardiaques. Pour ce faire, nous imageons à 500 Hz pendant un ou deux cycles cardiaques pour produire une image CBV. Pour l'imagerie du rat, cela implique une image toute les 200 ms à 400 ms, au mieux.
- Les puissances de calcul des échographes utilisés ne sont pas suffisantes. Lors d'une acquisition durant plusieurs minutes, les données brutes générées sont trop importantes pour être stockées sur la mémoire vive de l'ordinateur de l'échographe ou écrites sur un disque dur. Il est nécessaire de procéder à la formation de voies de ces données, avant d'enregistrer ces données. Or, les vitesses d'exécution de la formation de voies sur carte graphique restent inférieures à la vitesse de génération des données brutes. Il est donc nécessaire de faire des pauses entre chaque bloc de 400 ms de tirs ultrasonores pour permettre à l'ordinateur de calculer puis de stocker les images échographiques.

1.4.5.2. *Une imagerie 2D uniquement*

Jusqu'à aujourd'hui, les sondes échographiques utilisées pour réaliser l'imagerie fUS sont des réseaux linéaires. Ce qui implique qu'il n'est possible d'imager que dans un plan, en 2D. Il est possible de monter la sonde sur un jeu de moteurs de manière à produire des volumes vasculaires par tomographie en utilisant le doppler ultrarapide (Demené et al., 2015b). Toutefois, il faut entre quelques minutes à une heure pour obtenir un seul volume vasculaire. Il est donc proscrit de réaliser une imagerie fonctionnelle avec une telle technique.

1.5. Conclusion du chapitre et plan du manuscrit

Au cours de ce chapitre introductif, nous avons pu découvrir le système visuel et le cerveau. Nous avons vu comment l'imagerie par ultrasons fonctionnels permet aujourd'hui d'imager le cerveau d'une manière inédite basée sur les variations de CBV.

Nous avons vu que le fUS était une technique bien adaptée à l'étude préclinique de la vision notamment grâce à sa bonne profondeur d'imagerie et à l'environnement peu contraignant qu'il nécessite. C'est donc ce que nous avons tâché de faire au cours de cette thèse, dans le cadre du projet HELMHOLTZ.

Dans la suite de ce manuscrit, nous allons explorer le système visuel, de son entrée (l'œil), à une de ses sorties (le déclenchement d'une action en fonction d'une règle comportementale). Nous commencerons donc par voir comment réaliser l'imagerie fonctionnelle par ultrasons de la rétine. Dans ce cas, nous verrons les contraintes imposées par un milieu pouvant bouger de manière coordonnée avec la stimulation et comment concevoir une imagerie fonctionnelle par ultrasons centrée sur 30 MHz.

Nous nous attarderons ensuite sur l'imagerie du système visuel du rat anesthésié. Nous montrerons l'existence de paramètres de stimulation optimaux que nous utiliserons ensuite pour explorer ce système en trois dimensions et pour étudier la vitesse de réponse CBV des diverses aires impliquées. Nous appliquerons ensuite notre méthode à des cas de restaurations visuelles afin d'en voir les effets sur le cerveau.

Nous terminerons notre exploration de la vision par l'étude de primates éveillés exécutant une tâche comportementale oculomotrice sur la base d'un entraînement. Après une rapide étude des aires visuelles du primate, nous verrons l'activation d'une zone impliquée dans la supervision de ces tâches ainsi que ses réactions face à l'erreur.

Enfin, nous réutiliserons les outils mis au point au cours de cette thèse pour étudier la faisabilité du suivi chronique de souris soumises à un traitement faisant varier leur CBV à l'échelle de plusieurs jours. Nous verrons les principales contraintes de ce type d'études et tâcherons de proposer quelques pistes pour les contourner.

1.6. Bibliographie

- Baillet, S., Mosher, J.C., Leahy, R.M., 2001. Electromagnetic brain mapping. *IEEE Signal Process. Mag.* 18, 14–30. doi:10.1109/79.962275
- Beard, P., 2011. Biomedical photoacoustic imaging. *Interface Focus* 1, 602–31. doi:10.1098/rsfs.2011.0028
- Bruyns-Haylett, M., Zheng, Y., Berwick, J., Jones, M., 2010. Temporal coupling between stimulus-evoked neural activity and hemodynamic responses from individual cortical columns. *Phys. Med. Biol.* 55, 2203–2219. doi:10.1088/0031-9155/55/8/006
- Buxton, R.B., Wong, E.C., Frank, L.R., 1998. Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation: the balloon model. *Magn Reson Med* 39, 855–864. doi:10.1002/mrm.1910390602
- Chuang, A.T., Margo, C.E., Greenberg, P.B., 2014. Retinal implants: a systematic review. *Br. J. Ophthalmol.* 98, 852–856. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-303708
- Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A.K., Miesenbock, G., Ting, A., Schnitzer, M.J., 2006. Next-Generation Optical Technologies for Illuminating Genetically Targeted Brain Circuits. *J. Neurosci.* 26, 10380–10386. doi:10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006
- Demené, C., Deffieux, T., Pernot, M., Osmanski, B.-F., Biran, V., Franqui, S., Correas, J.-M., Cohen, I., Baud, O., Tanter, M., 2015a. Spatiotemporal clutter filtering of ultrafast

- ultrasound data highly increases Doppler and fUltrasound sensitivity. *IEEE Trans. Med. Imaging PP*, 1. doi:10.1109/TMI.2015.2428634
- Demené, C., Tiran, E., Sieu, L.A., Bergel, A., Gennisson, J.L., Pernot, M., Deffieux, T., Cohen, I., Tanter, M., 2015b. 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. *Neuroimage* 127, 472–483. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.11.014
- Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W., 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73–6. doi:10.1126/science.2321027
- Douar, A.M., Bouquet, C., Pruneau, D., Chavas, J., Dalkara, D., Duebel, J., Benosman, R., Chenegros, G., Picaud, S., Sahel, J., Thomasson, N., 2016. 268. Optogenetic Engineering of Retinal Ganglion Cells with AAV2.7m8-ChrimsonR-tdTomato (GS030-DP) Is Well Tolerated and Induces Functional Responses to Light in Non-Human Primates. *Mol. Ther.* 24, S106–S107. doi:10.1016/S1525-0016(16)33077-5
- Dougherty, R.F., Koch, V.M., Brewer, A. a, Fischer, B., Modersitzki, J., Wandell, B. a, 2003. Visual field representations and locations of visual areas V1/2/3 in human visual cortex. *J. Vis.* 3, 586–598. doi:10.1167/3.10.1
- Duebel, J., Marazova, K., Sahel, J.-A., 2015. Optogenetics. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 26, 226–32. doi:10.1097/ICU.000000000000140
- Errico, C., Osmanski, B.F., Pezet, S., Couture, O., Lenkei, Z., Tanter, M., 2016. Transcranial functional ultrasound imaging of the brain using microbubble-enhanced ultrasensitive Doppler. *Neuroimage* 124, 752–761. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.09.037
- Frostig, R.D., Lieke, E.E., Ts'o, D.Y., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6082–6086. doi:10.1073/pnas.87.16.6082
- Galvani, L., 1791. De viribus electricitatis in motu musculari, commentarius. *Bonon. Sci. Art. Inst. Acad.* 7, 364–415.
- Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R.D., Gilbert, C.D., Wiesel, T.N., 1986. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324, 361–364. doi:10.1038/324361a0
- Hämäläinen, M., Hari, R., Ilmoniemi, R.J., Knuutila, J., Lounasmaa, O. V., 1993. Magnetoencephalography theory, instrumentation, and applications to noninvasive studies of the working human brain. *Rev. Mod. Phys.* 65, 413–497. doi:10.1103/RevModPhys.65.413
- Herlitze, S., Landmesser, L.T., 2007. New optical tools for controlling neuronal activity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 87–94. doi:10.1016/j.conb.2006.12.002
- Hillman, E.M.C., Devor, A., Bouchard, M.B., Dunn, A.K., Krauss, G.W., Skoch, J., Bacsikai, B.J., Dale, A.M., Boas, D.A., 2007. Depth-resolved optical imaging and microscopy of vascular compartment dynamics during somatosensory stimulation. *Neuroimage* 35, 89–104. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.11.032
- Humayun, M.S., Dorn, J.D., da Cruz, L., Dagnelie, G., Sahel, J., Stanga, P.E., Cideciyan, A. V, Duncan, J.L., Elliott, D., Filley, E., Ho, A.C., Santos, A., Safran, A.B., Ardit, A., Del Priore, L. V, Greenberg, R.J., 2013. Interim Results from the International Trial of Second Sight's Visual Prosthesis. *Ophthalmology* 119, 779–788. doi:10.1016/j.ophtha.2011.09.028.Interim
- Kalatsky, V. a., Stryker, M.P., 2003. New paradigm for optical imaging: Temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron* 38, 529–545. doi:10.1016/S0896-6273(03)00286-1

- Lorach, H., Goetz, G., Mandel, Y., Lei, X., Kamins, T.I., Mathieson, K., Huie, P., Dalal, R., Harris, J.S., Palanker, D., 2015. Performance of photovoltaic arrays in-vivo and characteristics of prosthetic vision in animals with retinal degeneration. *Vision Res.* 111, 142–148. doi:10.1016/j.visres.2014.09.007
- Macé, E., Caplette, R., Marre, O., Sengupta, A., Chaffiol, A., Barbe, P., Desrosiers, M., Bamberg, E., Sahel, J.-A., Picaud, S., Duebel, J., Dalkara, D., 2015. Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV Restores ON and OFF visual responses in blind mice. *Mol. Ther.* 23, 7–16. doi:10.1038/mt.2014.154
- Macé, E., Montaldo, G., Cohen, I., Baulac, M., Fink, M., Tanter, M., 2011. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat. Methods* 8, 662–4. doi:10.1038/nmeth.1641
- Macé, E., Montaldo, G., Osmanski, B.-F., Cohen, I., Fink, M., Tanter, M., 2013. Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 60, 492–506. doi:10.1109/TUFFC.2013.2592
- Martindale, J., Mayhew, J., Berwick, J., Jones, M., Martin, C., Johnston, D., Redgrave, P., Zheng, Y., 2003. The hemodynamic impulse response to a single neural event. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 546–555. doi:10.1097/01.WCB.0000058871.46954.2B
- Montaldo, G., Tanter, M., Bercoff, J., Benech, N., Fink, M., 2009. Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 56, 489–506.
- Niedermeyer, E., Lopes Da Silva, F., 2005. *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields.*
- NIH, 2017. Compensation for Blindness With the Intelligent Retinal Implant System (IRIS V2) in Patients With Retinal Dystrophy - Full Text View - ClinicalTrials.gov [WWW Document]. URL <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02670980?term=Pixium&rank=1>
- Niranjan, A., Christie, I.N., Solomon, S.G., Wells, J.A., Lythgoe, M.F., 2016. fMRI mapping of the visual system in the mouse brain with interleaved snapshot GE-EPI. *Neuroimage* 139, 337–345. doi:10.1016/j.neuroimage.2016.06.015
- Nolte, J., 2009. *The Human Brain: An Introduction to Its Functional Anatomy.*
- Ogawa, S., Lee, T.M., Kay, A.M., Tank, D.W., 1990. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9868–72. doi:10.1073/pnas.87.24.9868
- Osmanski, B.F., Martin, C., Montaldo, G., Lanièce, P., Pain, F., Tanter, M., Gurden, H., 2014a. Functional ultrasound imaging reveals different odor-evoked patterns of vascular activity in the main olfactory bulb and the anterior piriform cortex. *Neuroimage* 95, 176–84. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.03.054
- Osmanski, B.F., Pezet, S., Ricobaraza, A., Lenkei, Z., Tanter, M., 2014b. Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nat. Commun.* 5, 5023. doi:10.1038/ncomms6023
- PixiumVisionSA, 2017. PIXIUM VISION - Restauration visuelle, vision bionique, redonner la vue [WWW Document]. URL http://www.pixium-vision.com/fr/essai_clinique/temoignages
- Roy, C., Sherrington, C., 1890. On the Regulation of the Blood-Supply of the Brain. *J. Physiol.* 11, 85–158. doi:10.1186/1471-244X-11-115
- Rubin, J.M., Bude, R.O., Carson, P.L., Bree, R.L., Adler, R.S., 1994. Power Doppler US: a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. *Radiology* 190,

853–856. doi:10.1177/875647939601200315

- Sandrin, L., Catheline, S., Tanter, M., Hennequin, X., Fink, M., 1999. Time-Resolved Pulsed Elastography with Ultrafast Ultrasonic Imaging. *Ultrason. Imaging* 21, 259–272. doi:10.1177/016173469902100402
- Sandrin, L., Tanter, M., Catheline, S., Fink, M., 2002. Shear Modulus Imaging with 2-D transient elastography. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 40, 426–435. doi:10.1109/58.996560
- Saul, A.B., Feidler, J.C., 2002. Development of Response Timing and Direction Selectivity in Cat Visual Thalamus and Cortex. *J. Neurosci.* 22, 2945–2955.
- Scanziani, M., Häusser, M., 2009. Electrophysiology in the age of light. *Nature* 461, 930–939. doi:10.1038/nature08540
- Schneider, K. a, Richter, M.C., Kastner, S., 2004. Retinotopic organization and functional subdivisions of the human lateral geniculate nucleus: a high-resolution functional magnetic resonance imaging study. *J. Neurosci.* 24, 8975–8985. doi:10.1523/JNEUROSCI.2413-04.2004
- Sengupta, A., Chaffiol, A., Macé, E., Caplette, R., Desrosiers, M., Lampič, M., Forster, V., Marre, O., Lin, J.Y., Sahel, J., Picaud, S., Dalkara, D., Duebel, J., 2016. Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina. *EMBO Mol. Med.* 8, 1248–1264. doi:10.15252/emmm.201505699
- Sheth, S.A., Nemoto, M., Guiou, M., Walker, M., Pouratian, N., Hageman, N., Toga, A.W., 2004. Columnar Specificity of Microvascular Oxygenation and Volume Responses: Implications for Functional Brain Mapping. *J. Neurosci.* 24, 634–641. doi:10.1523/JNEUROSCI.4526-03.2004
- Shih, A.Y., Driscoll, J.D., Drew, P.J., Nishimura, N., Schaffer, C.B., Kleinfeld, D., 2012. Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1277–1309. doi:10.1038/jcbfm.2011.196
- Shih, A.Y., Friedman, B., Drew, P.J., Tsai, P.S., Lyden, P.D., Kleinfeld, D., 2009. Active dilation of penetrating arterioles restores red blood cell flux to penumbral neocortex after focal stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 738–751. doi:10.1038/jcbfm.2008.166
- Sieu, L.-A., Bergel, A., Tiran, E., Deffieux, T., Pernot, M., Gennisson, J.-L., Tanter, M., Cohen, I., 2015. EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats. *Nat Methods* 12, 831–834. doi:10.1038/nmeth.3506
- Tanter, M., Bercoff, J., Sandrin, L., Fink, M., 2002. Ultrafast compound imaging for 2-D motion vector estimation: application to transient elastography. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 49, 1363–1374. doi:10.1109/TUFFC.2002.1041078
- Tian, L., Hires, S.A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M.E., Chalasani, S.H., Petreanu, L., Akerboom, J., McKinney, S.A., Schreiter, E.R., Bargmann, C.I., Jayaraman, V., Svoboda, K., Looger, L.L., 2009. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat. Methods* 6, 875–881. doi:10.1038/nmeth.1398
- Tiran, E., Ferrier, J., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Pezet, S., Lenkei, Z., Tanter, M., 2017. Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent. *Ultrasound Med. Biol.* 1–11. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.011
- Vandenbergh, L.H., Auricchio, A., 2012. Novel adeno-associated viral vectors for retinal gene therapy. *Gene Ther.* 19, 162–8. doi:10.1038/gt.2011.151
- Wang, X., Pang, Y., Ku, G., Xie, X., Stoica, G., Wang, L.L. V, Gamelin, J., Maurudis, A., Aguirre,

A., Huang, F., Guo, P., Wang, L.L. V, Zhu, Q., Xia, J., Huang, C., Maslov, K., Anastasio, M. a, Wang, L.L. V, 2003. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat. Biotechnol.* 21, 803–6. doi:10.1038/nbt839

Wikipédia, C. de, n.d. Système visuel [WWW Document]. Wikipédia, l'encyclopédie Libr.

Yao, J., Wang, L., Yang, J.-M., Maslov, K.I., Wong, T.T.W., Li, L., Huang, C.-H., Zou, J., Wang, L. V, 2015. High-speed label-free functional photoacoustic microscopy of mouse brain in action. *Nat. Methods* 12, 407–10. doi:10.1038/nmeth.3336

Zehnder, T., Tiedtke, H.-J., 2008. Implant épirétinal extraoculaire.

Zhang, F., Vierock, J., Yizhar, O., Fenno, L.E., Tsunoda, S., Kianianmomeni, A., Prigge, M., Berndt, A., Cushman, J., Polle, J., Magnuson, J., Hegemann, P., Deisseroth, K., 2011. The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell* 147, 1446–1457. doi:10.1016/j.cell.2011.12.004

2. La rétine et la choroïde imagées par ultrasons fonctionnels

Peut-on visualiser un couplage neurovasculaire et détecter une activation fonctionnelle dans la rétine par ultrasons ? C'est la question à laquelle nous tentons de répondre dans ce chapitre. A travers une imagerie de la rétine de primates non-humains et de rats, nous avons développé une nouvelle imagerie à très haute fréquence et des procédés adaptés à ces problématiques.

2.1. Rappel sur la rétine et résultats attendus

Commençons par rappeler brièvement ce que nous avons vu en 1.1.1 sur la rétine et la choroïde. La rétine est la partie photosensible de l'œil et elle en tapisse le fond. Elle est constituée de cellules photosensibles, appelées photorécepteurs et d'autres dont la structure est similaire à celle des neurones. L'association de ces cellules permet de transformer l'information lumineuse en signal électrochimique transmis au nerf optique puis au cerveau. Ces cellules sont alimentées en nutriments et en oxygène par la choroïde, un dense réseau vasculaire derrière la rétine.

Ainsi de façon similaire à ce qu'on connaît du cerveau (voir 1.3.2.1), on observe au fond de l'œil l'association de cellules neuronales et d'un dense réseau vasculaire. Dès lors, quand les premières sont activées, on s'attend à une réponse neurovasculaire dans le second.

Un tel couplage neurovasculaire a, en effet, été décrit (Newman, 2013). Il est possible d'observer une augmentation des flux sanguins pendant une stimulation lumineuse par vélocimétrie Laser ou LDF (*Laser Doppler Flowmetry*) chez l'humain, le singe ou le chat (Michelson et al., 2002; Riva et al., 2005, 1991), de même qu'il est possible de réaliser des IRM fonctionnelles en détectant et en cartographiant des augmentations du signal BOLD dans la rétine pendant des stimuli visuels chez le chat ou le rat (Duong et al., 2002; La Garza et al., 2011).

Ainsi, en appliquant notre imagerie fonctionnelle par ultrasons, nous espérons détecter et cartographier pour la première fois ces augmentations des flux sanguins avec la résolution spatiotemporelle autorisée par les ultrasons.

2.2. Imagerie de l'œil de primates non-humains

Nous commençons cette étude par l'imagerie de la rétine de macaques. L'œil des macaques fait sensiblement la même taille que l'œil humain et comme chez tous les simiiformes (les singes), il est pourvu d'une fovéa (une petite dépression au centre de la rétine, d'une très grande acuité). Son diamètre de 2 cm environ est bien adapté aux sondes utilisées habituellement sur le cerveau du rongeur. Ce qui permet un transfert simple des protocoles d'imagerie cérébrale préexistants.

En outre, nous profitons pour ces expérimentations d'un protocole expérimental dont nous parlerons au chapitre 4, qui nous permet de réaliser cette imagerie simplement en raison de l'instrumentation légère et de la simple anesthésie qu'elle nécessite.

2.2.1. Matériel et méthodes

2.2.1.1. *Modèle animal*

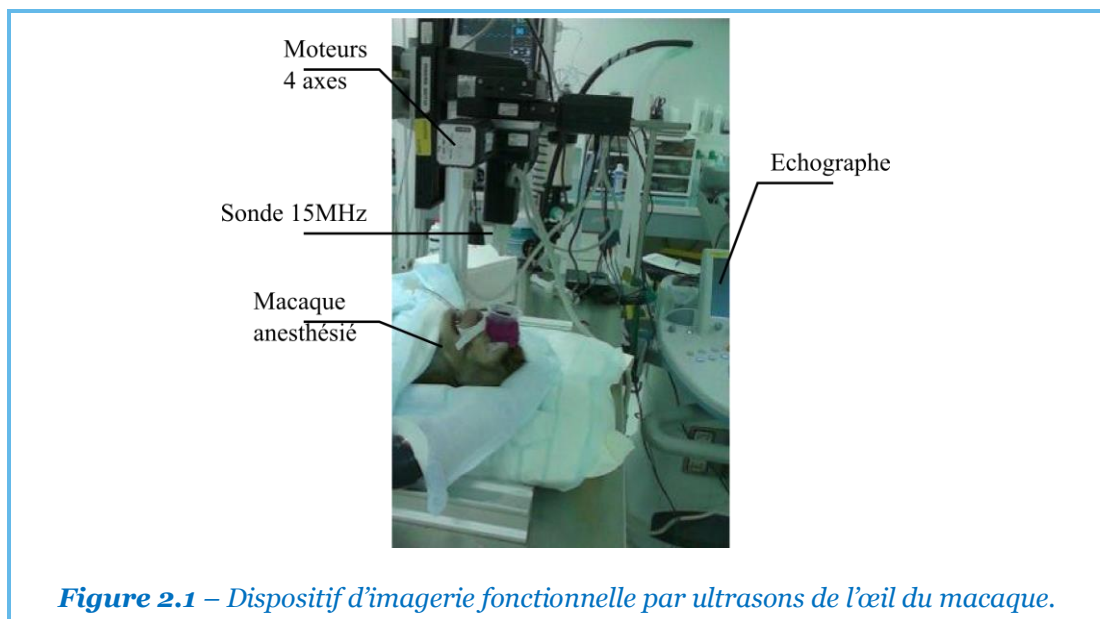
Les animaux utilisés ici sont deux macaques mâles, nés en captivité. Le protocole décrit ici respecte les directives européennes et a été approuvé par le Comité Régional d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale (Protocole #541 et #5365, comité éthique Paris Darwin) (voir 4.3.2.1 pour plus de détails).

Pour l'imagerie, on administre un anesthésiant par voie intrapéritonéale qui sera actif une heure, de manière à limiter les potentiels risques de séquelles liées à l'anesthésie. Afin de s'affranchir des mouvements réflexes de l'œil étudié, ses muscles oculomoteurs sont bloqués mécaniquement à l'aide de petites pinces utilisées en routine clinique, lors des chirurgies ophtalmiques. Du gel couplant acoustique stérile est ensuite disposé sur l'œil, paupière ouverte. La température du singe est maintenue à 36°C avec une couverture chauffante et son rythme cardiaque est surveillé tout au long de l'expérience.

L'éclairage de la pièce est éteint afin d'obtenir une meilleure réponse aux stimuli visuels.

2.2.1.2. Pilotage de la sonde

Une sonde échographique centrée à 15 MHz (128 éléments, pas 110 μm , focale en élévation 8 mm, Vermon ; Tours, France) est amenée au contact de l'œil. Cette sonde est montée sur un jeu de quatre moteurs (trois translations : VT-80 Pollux et une rotation : DT-80 Pollux, PI Micos ; Allemagne) pour permettre un positionnement facile de la sonde. La sonde est pilotée par un échographe ultrarapide (Aixplorer, Supersonic Imagine ; Aix-en-Provence, France) (Voir **Figure 2.1**).



2.2.1.3. Séquence d'imagerie fUS

Les animaux que nous imageons ont un rythme cardiaque aux environs de 100 battements par minute. Les paramètres d'imagerie que nous choisissons sont donc les suivants : Nous réalisons une image CBV toutes les 3 s. Chaque image est la somme incohérente de 500 images ultrasonores acquises à 830 Hz, en 0,6 s (soit la durée d'un cycle cardiaque). Chaque image ultrasonore est la somme cohérente de 3 images en ondes planes dont les angles sont $[-4^\circ ; 0^\circ ; 4^\circ]$.

Nous imageons ainsi l'œil pendant 90 s. A l'issue de ces 90 s, nous marquons une pause, puis recommençons cette imagerie. On réalise ainsi trois films CBV de 90 s ; qui sont ensuite concaténés pour avoir un film d'une durée totale de 270 s.

2.2.1.4. Stimulation visuelle

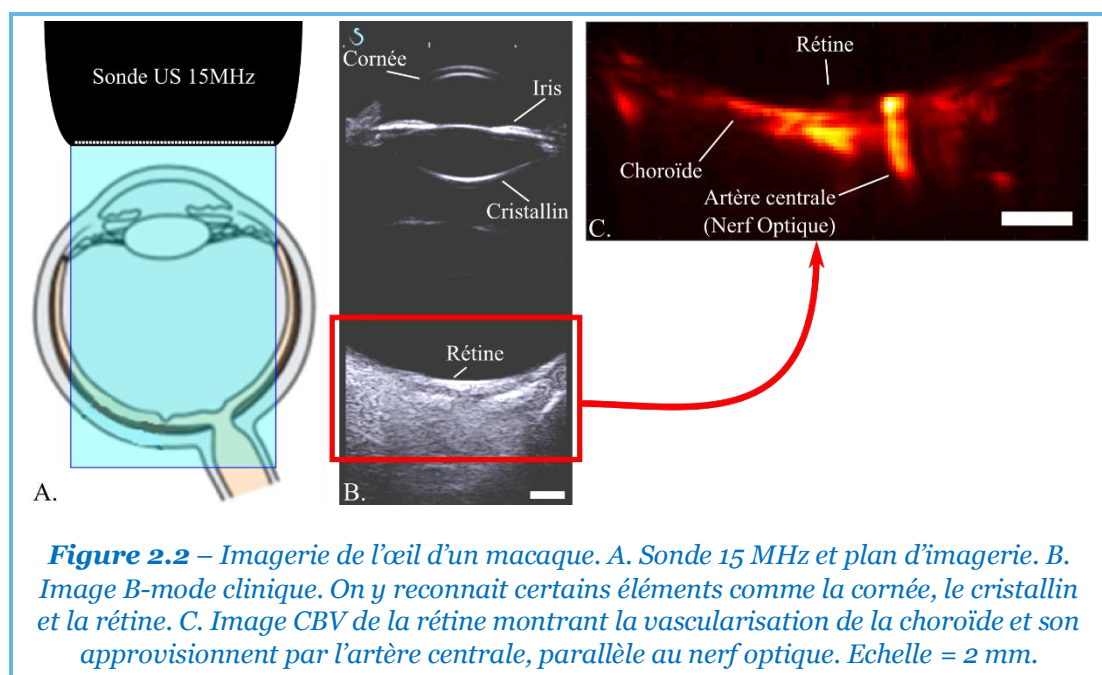
Une diode électroluminescente blanche est attachée à la sonde, de manière à ce que le positionnement soit aisé. Cette diode est pilotée par un générateur de fonction, synchronisé avec l'échographe.

Pendant les 90 s d'imagerie, nous délivrons le stimulus suivant : 20 s de repos, diode éteinte, suivies de 5 s de stimulation (diode allumée ou clignotante), le tout répété trois fois puis suivi de 25 s de repos. La luminosité de la diode est réglée approximativement pour ne pas être désagréable à regarder. Ainsi, après concaténation des trois films, on aura stimulé 9 fois.

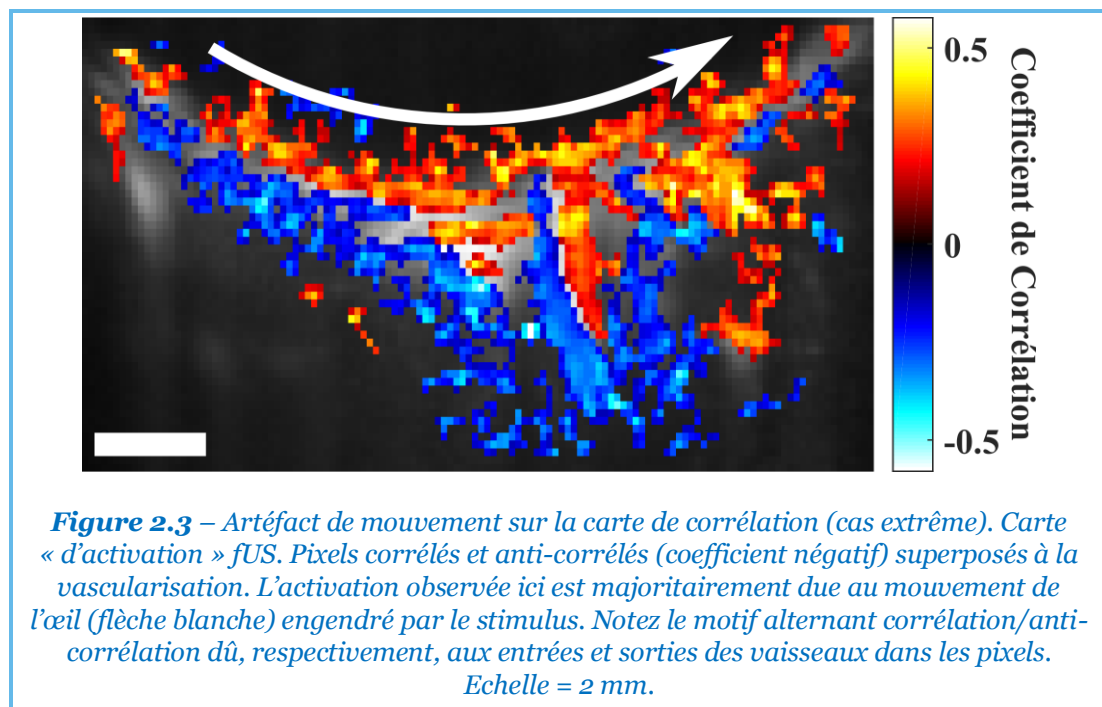
2.2.2. Résultats

Commençons par analyser le résultat simple de l'imagerie d'un œil, sur la **Figure 2.2**. L'échographe que nous utilisons dispose également d'un mode d'imagerie échographique conventionnelle utilisable en clinique, communément appelé B-mode. Nous en profitons donc pour vérifier qu'on observe bien l'anatomie de l'œil.

On réalise ensuite une image en Doppler de puissance ultrasensible, sur laquelle on remarque la vascularisation de la choroïde ainsi que l'artère et la veine centrale de la rétine qui longent le nerf optique.



En revanche, nous observons également un mouvement global de la rétine au moment des stimuli. Malgré notre blocage mécanique, nous observons le réflexe oculomoteur. Ce « roulement » de l'œil ayant lieu dans notre plan d'imagerie mais aussi hors du plan d'imagerie, il n'est pas possible d'utiliser une méthode de recalage des images pour supprimer ce mouvement en post-traitement. Nous avons donc un mouvement corrélé à notre stimulus qui noie les augmentations de flux sanguin que nous voulons détecter. En effet, ce mouvement fait bouger la vascularisation, or pour notre analyse nous suivons le profil temporel des pixels du film CBV. Si un vaisseau bouge, il peut entrer dans un pixel (ou en sortir). Le profil temporel de ce pixel va donc augmenter (ou diminuer). Cette variation est forte et a précisément lieu en même temps que la réponse hémodynamique que nous espérons détecter. Ainsi notre opération de corrélation détecte principalement ce mouvement plutôt qu'une éventuelle augmentation de flux. Lorsque le mouvement dans le plan est assez important, on va observer des motifs « d'activation » alternant corrélation et anti-corrélation reconnaissables et représentés sur la **Figure 2.3**. Ainsi les cartes d'activation fUS sont inexploitable, ce qui rend notre analyse difficile sans un perfectionnement de l'instrumentation.



Pour mener cette étude au bout, il faut complexifier le protocole. Ainsi, une injection de toxine botulique ou de dérivés du curare est nécessaire pour paralyser les muscles (Duong et al., 2002; La Garza et al., 2011). Toutefois, ce protocole, plus lourd et plus risqué, n'est pas couvert par nos autorisations éthiques. Nous changeons donc de modèle animal pour nous tourner vers le rat.

2.3. Imagerie de l'œil du rat

L'œil du rat est bien plus petit (4 mm de diamètre environ) que l'œil des primates mais il est aussi moins mobile. Nous espérons donc pouvoir réaliser une imagerie fUS sans paralysie et donc sans avoir à utiliser une instrumentation lourde d'intubation et de respiration artificielle nécessaire lorsque l'animal est paralysé (La Garza et al., 2011). L'objectif est donc d'être capable d'imager ce petit organe. C'est pourquoi nous avons développé une imagerie à 30 MHz avec une nouvelle sonde ultrasonore centrée à cette fréquence.

2.3.1. Matériel et méthodes

2.3.1.1. *Modèle animal et stimuli*

Les animaux utilisés ici sont deux rats mâles de la souche Sprague Dawley fournis par Janvier Labs (France), de 8 semaines, pesant 350 g environ. Hébergés à deux par cages, avec eau et nourriture en libre accès, ils sont maintenus dans des conditions standards (cycles jour/nuit de 12/12 h à une température de 22°C). Nos expériences ont été conduites en respectant les directives européennes (2010/63/EU) et le protocole expérimental approuvé par le Comité Régional d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale (CREEA) n°5 (dossier n°5486).

L'imagerie que nous réalisons ne nécessite pas de chirurgie. L'animal est simplement anesthésié par voie intrapéritonéale avec une injection de kétamine (40 mg/kg, Imalgene 1000®, Merial ; France) et de médétomidine (0,3 mg/kg, Domitor®, Pfizer Santé Animal ; France). L'anesthésie est ensuite maintenue en réinjectant cette solution à 1/3 de la dose initiale toutes les 45 minutes. L'animal est ensuite placé dans un cadre stéréotaxique. Sa température est maintenue à 37°C avec un tapis et une couverture chauffante tout au long de la séance. A la fin de la séance d'imagerie, l'animal est réveillé par l'injection intrapéritonéale de 50 µL de solution d'un antagoniste de la médétomidine (Antisédan®, Vétoquinol ; France).

Le reste du protocole change peu par rapport à ce qu'on a vu précédemment. On dispose du gel échographique sur l'œil, on amène la sonde échographique au contact de l'œil. Une diode blanche pilotée par un générateur de fonction permet de délivrer les stimuli qui consistent en 30 s de repos, diode éteinte, puis 20 s de clignotement à 3 Hz, le tout répété pendant 10 minutes. L'animal est maintenu dans le noir en dehors des périodes de stimulation.

Pour un des deux rats, on applique au préalable un collyre à l'atropine 1% (Laboratoires Europhtha ; Monaco) sur l'œil qu'on veut imager. Ce collyre inhibe la contraction réflexe de l'iris.

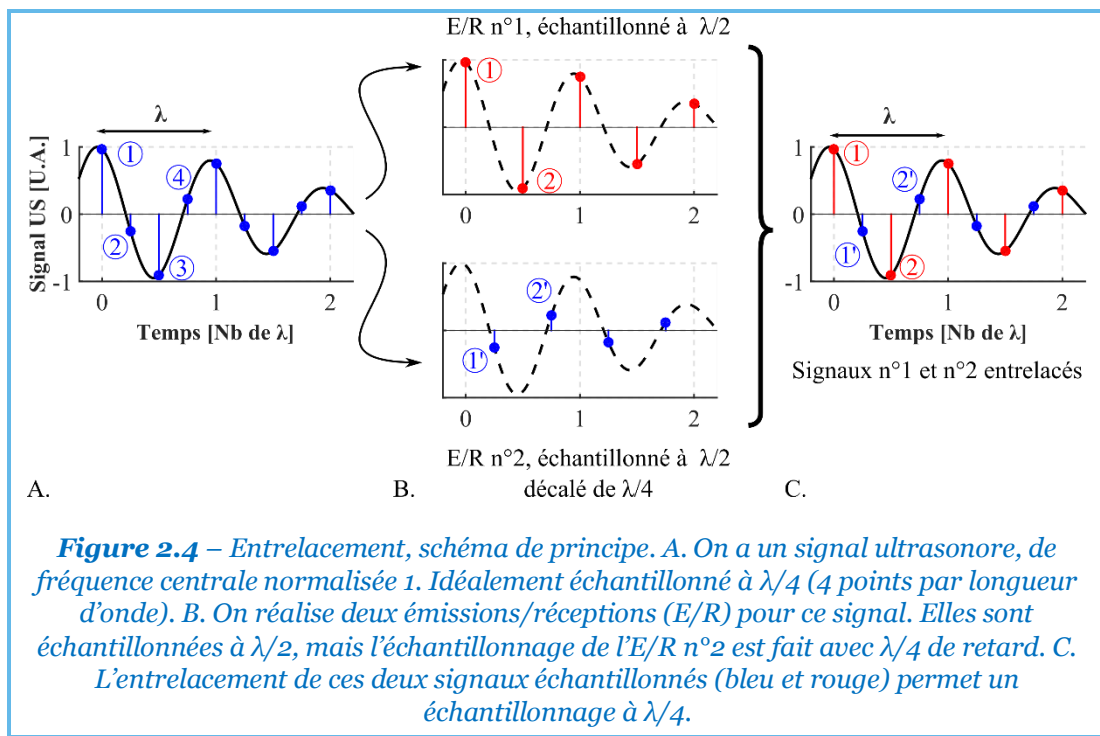
2.3.1.2. *Imagerie ultrarapide à 30 MHz*

2.3.1.2.1. Entrelacement

Afin d'atteindre une résolution permettant d'imager proprement l'œil du rat, nous avons dû écarter la sonde centrée à 15 MHz, utilisée généralement au laboratoire en

imagerie du petit animal, pour une nouvelle sonde centrée vers 30 MHz (fréquence centrale 28 MHz, 128 éléments, pas 70 μm , focale en élévation 8 mm, Vermon ; Tours, France). Nous la pilotons avec un échographe de recherche Verasonics (Kirkland, USA). Toutefois, réaliser une imagerie fonctionnelle à cette fréquence a nécessité quelques améliorations techniques et algorithmiques.

Le principal défi de cette imagerie est rencontré lors de la réception et de l'échantillonnage par l'échographe des signaux acoustiques rétrodiffusés par les tissus (voir 1.4.1 et 1.4.3.1). A ce moment, le signal acoustique ultrasonore analogique est converti en signal numérique. Dans notre cas, il faut que l'échantillonnage soit fait à une fréquence 4 fois supérieure à la fréquence centrale du signal acoustique et avoir ainsi 4 échantillons par période temporelle (ou longueur d'onde). Cette limite nous est imposée par notre procédé de formation de voies. Or les échographes que nous utilisons ont une fréquence d'échantillonnage maximale de 60 MHz. Ce qui est donc juste suffisant pour l'imagerie à 15 MHz mais insuffisant à 30 MHz, où l'on ne peut avoir, au mieux, que 2 échantillons par longueur d'onde.



Il existe différentes méthodes pour augmenter artificiellement la fréquence d'échantillonnage et ainsi résoudre notre problème. Nous avons choisi d'appliquer une méthode appelée « Entrelacement » (*Interleaving* en anglais). Le principe de l'entrelacement est simple (voir **Figure 2.4**), il consiste à dédoubler chaque couple d'émission/réception ultrasonore, d'échantillonner les signaux résultants à 2 échantillons par longueur d'onde, mais de décaler temporellement la deuxième émission (ou réception) d'un quart de période. On entrelace ensuite les deux jeux d'échantillons en un seul pour que le jeu final ait 4 échantillons par longueur d'onde. Du point de vue de ce signal échantillonné final et sous l'hypothèse que les deux émissions/réceptions sont physiquement identiques (et donc que le milieu ne bouge

pas trop entre les deux), tout se passe comme si on n'avait réalisé qu'une seule émission/réception échantillonnée à 4 points par longueur d'onde. On peut ensuite utiliser ce signal dans l'algorithme de formation de voies sans (trop) de changement (en pratique, on a intégré l'entrelacement au code de formation de voies de sorte qu'il puisse être fait à la volée sur carte graphique et ainsi gagner un temps de calcul considérable).

2.3.1.2.2. Multiplane Wave Imaging

Dans la mesure où l'on souhaite imager la rétine de l'œil du rat, *i.e.* un objet relativement profond par rapport à la fréquence utilisée et que les objets proches de la sonde sont, ici, d'un moindre intérêt, on utilise le procédé de *Multiplane Wave Imaging* (Tiran et al., 2015). Cette technique permet, en émettant *successivement* plusieurs ondes planes lors de l'émission/réception, d'augmenter le rapport signal à bruit en profondeur, sans augmenter l'intensité des signaux émis. La contrepartie est de perdre en visibilité dans le champ proche de la sonde en raison de la nécessité d'attendre la fin de l'émission de ces longues codas temporelles avant de pouvoir recevoir les signaux rétrodiffusés (voir **Figure 2.6A**).

Afin de conserver la même cadence d'imagerie, au préalable, nous avons également implémenté un algorithme sur carte graphique capable de réaliser rapidement la formation de voie particulière et les opérations que ce type d'émission nécessite.

2.3.1.2.3. Séquence d'imagerie fUS

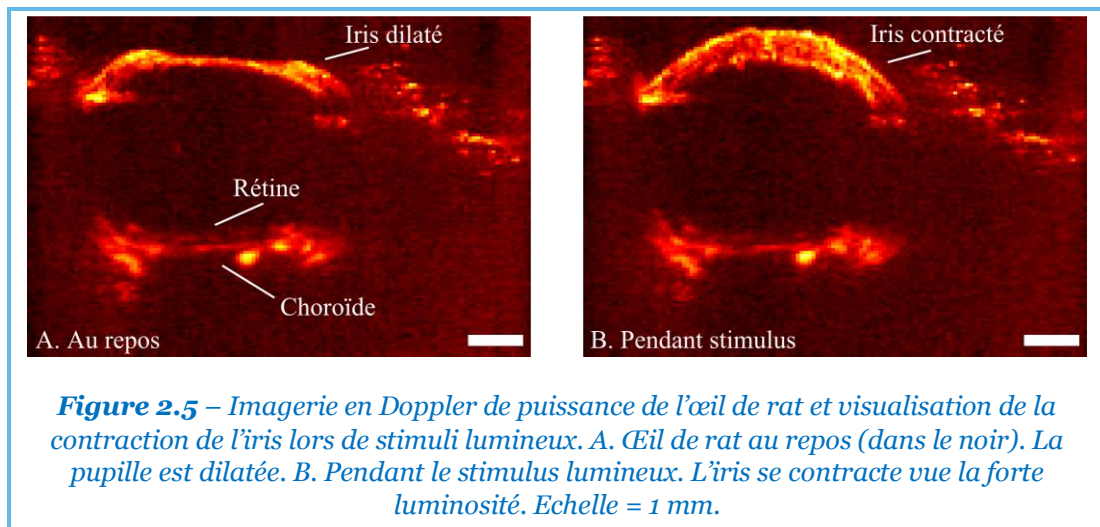
A l'issue de l'implémentation de ces deux procédés. On est capable de réaliser une séquence d'imagerie fonctionnelle par ultrasons. On choisit les paramètres suivants : 1 image CBV par seconde, résultant de la somme incohérente de 400 images ultrasonores filtrées par SVD et acquises à 1000 images par seconde, en 0,4 s (2 cycles cardiaques du rat). Chaque image ultrasonore est la somme cohérente de 4 images en ondes planes avec des angles différents. Les images obtenues couvrent un champ de vue de $8,89 \times 5 \text{ mm}^2$ et contiennent 128×101 pixels pour une résolution de $70 \times 50 \mu\text{m}^2$. Pendant les 10 minutes de stimulation, on réalise donc un film de 600 images.

2.3.2. Résultats

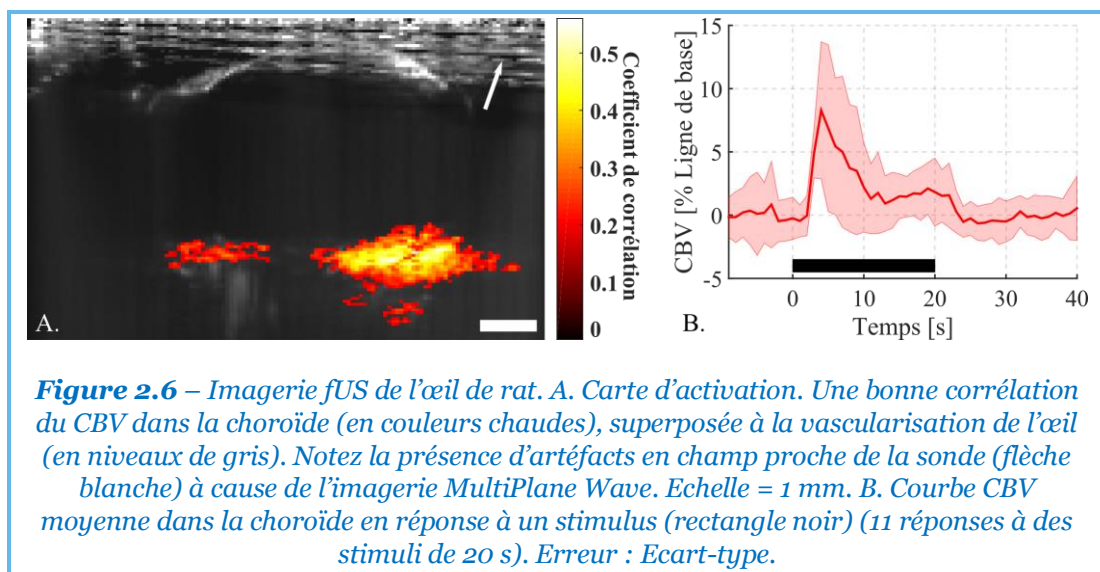
Commençons par analyser l'imagerie du rat qui n'a pas reçu de collyre à l'atropine (**Figure 2.5**). Sur les images du film en Doppler de puissance (en CBV), on visualise aisément les structures d'intérêt de notre imagerie, rétine et choroïde ainsi que la vascularisation de l'iris, dans le segment antérieur de l'œil. Sur ces mêmes images, on observe la contraction de l'iris et sa fermeture lorsqu'on présente notre stimulus lumineux. L'observation de cette contraction est très intéressante mais elle parasite ici notre imagerie fonctionnelle. En effet, il est probable que le mouvement généré dans l'iris se propage dans le reste de l'œil au moment des stimuli. En outre, un iris ouvert n'est pas équivalent à un iris fermé du point de vue des ultrasons qui le traversent. Ainsi les aberrations et l'atténuation en aval de cette structure varient certainement

lors de ces contractions. Ceci modifie très certainement le signal provenant des zones sous l'iris, et donc de la choroïde pendant les stimuli.

Cette intuition est confirmée lors du calcul des cartes de corrélation sur lesquelles on peut observer des artéfacts de mouvements similaires à ceux présentés sur la **Figure 2.3**.



Intéressons-nous maintenant à l'imagerie du rat qui a reçu du collyre à l'atropine. Le visionnage des films CBV révèle premièrement que ce collyre inhibe bien le réflexe de l'iris. On ne constate aucun mouvement dans le segment antérieur lors des stimuli. Par la suite, lorsqu'on réalise les cartes d'activation fUS, on n'observe pas d'artéfact de mouvement et on observe ce qui semble être une réponse du CBV dans la choroïde (**Figure 2.6**).



La forme de la réponse CBV dans la choroïde est également intéressante (**Figure 2.6B**). Elle présente, en effet, un pic important au début du stimulus puis redescend vers un plateau de faible intensité pendant la suite du stimulus. Ceci pourrait être dû à une habituation de l'œil au cours du stimulus ou à un résidu de réflexe oculomoteur au début du stimulus.

2.3.3. Discussion

On a vu ici qu'on était capable de réaliser l'imagerie en Doppler de puissance de l'œil de rat à 30 MHz grâce à l'implémentation des techniques d'entrelacement et de *MultiPlane Wave*. On est ainsi capable de détecter la contraction de l'iris lors de l'augmentation de la luminosité. Notons également, que cette contraction aurait également été observable en B-mode, puisque l'iris, apparaissait lors de cette imagerie sur l'œil de singe (**Figure 2.2B**). Toutefois, l'imagerie en Doppler de puissance montrant préférentiellement les structures vascularisées, elle permet de faire apparaître cette contraction avec un bon contraste. On a vu ensuite qu'administrer un collyre à l'atropine permet de stopper ce réflexe qui génère des artéfacts de mouvement dommageables à notre imagerie fonctionnelle. On a alors pu réaliser une imagerie fonctionnelle par ultrasons de l'activation rétinienne lors d'un stimulus lumineux grâce à la réponse hémodynamique de la choroïde.

2.3.3.1. Réponse CBV choroïdienne

En revanche, lorsqu'on compare nos courbes d'augmentation du CBV à celles obtenues par vélocimétrie laser (Riva et al., 2004, 1991), les ordres de grandeurs de l'augmentation et la forme de la réponse ne sont pas tout à fait les mêmes. En effet, par LDF, on mesure plutôt une augmentation douce jusqu'au plateau vers 20% d'augmentation, sans présence d'aucun pic en début de stimulus.

Ainsi ce pic de « CBV » pourrait être dû à un résidu de mouvement. En revanche, le plateau que nous observons ensuite semble plutôt concorder avec les observations faites en LDF. La différence d'amplitude dans la réponse peut avoir diverses causes. Ces travaux en LDF sont réalisés sur des humains éveillés et des chats anesthésiés, dont l'acuité visuelle et la sensibilité à la lumière sont plus grandes. Il est probable que le couplage neurovasculaire dans ces yeux soit plus fort (surtout chez l'homme éveillé).

Une deuxième raison à cette faible intensité de CBV observée vient de la physique de l'effet Doppler et de la géométrie du fond de l'œil. Le signal CBV dépend de l'orientation des vaisseaux sanguins par rapport à la sonde. Rappelons que l'effet Doppler est sensible aux diffuseurs se déplaçant dans la direction de la sonde. Lorsque le flux sanguin n'est pas orienté dans ce sens, l'effet Doppler est proportionnel à la composante *axiale* de la vitesse. Ainsi la sensibilité de l'imagerie en Doppler de puissance pâtit de ce phénomène quand les flux observés sont majoritairement transverses à la direction de propagation des ultrasons. En effet, la sensibilité diminue quand les vaisseaux sanguins sont inclinés d'un angle compris entre 70° et 110° (Macé et al., 2013). Or notre étude observant les vaisseaux du fond de l'œil nous place proche dans ce cas de faible sensibilité.

2.3.3.2. *A propos du mouvement*

Est-il certain que la corrélation mesurée sur la **Figure 2.6** est bien due à la réponse hémodynamique plutôt qu'à un réflexe oculomoteur ?

Aussi, on espère avoir assez réduit les possibilités de mouvement pour que l'influence de ce réflexe soit devenue minoritaire dans le signal CBV. Toutefois, ne pas l'observer sur les films CBV ou sur les cartes d'activation ne le garantit pas. Dans ce cas, il s'agirait d'un mouvement assez faible mais principalement en dehors du plan d'imagerie qui y ferait rentrer toute une zone plus vascularisée. Un tel mouvement pourrait être de différentes natures. Premièrement, il pourrait s'agir d'un roulement de l'œil. Or dans ce cas, la géométrie sphérique de l'œil ferait apparaître une réponse symétrique dans le segment antérieur que ne nous n'observons pas ici. Deuxièmement, il pourrait s'agir d'un cisaillement transitoire du fond de l'œil. Or de tels déplacements de l'ordre du millimètre, sur une échelle de temps de quelques secondes localisés à quelques millimètres carrés sont exclus puisque la vitesse de propagation d'un cisaillement dans les tissus biologiques est de l'ordre du m/s. Enfin, il pourrait s'agir d'un cisaillement statique du fond de l'œil qui aboutirait à chaque fois, à une entrée de vaisseaux sanguins dans le plan d'imagerie plus importante que leur sortie. Ce qui semble peu probable.

Ainsi, après ces diverses hypothèses sur la vitesse des flux, la géométrie, l'élastodynamique de l'œil, et la comparaison avec la littérature, on peut conclure qu'il est improbable que la réponse observée soit majoritairement due à ce mouvement. Pour s'affranchir de ces derniers doutes, il y a la possibilité de refaire l'expérience en paralysant l'animal. Soit avec une paralysie générale mais qui nécessite une intubation pour permettre une respiration artificielle, soit une paralysie locale assez efficace. Pour faire un contrôle supplémentaire, il est également possible d'administrer une substance inactivant les photorécepteurs et de voir si cette réponse disparaît.

2.4. Conclusion du chapitre et perspectives

Nous arrivons au bout de ce chapitre sur l'imagerie fonctionnelle de la rétine. Nous avons vu qu'il est possible d'obtenir de belles images de la rétine de primates en Doppler de puissance. Toutefois, chez le primate, les mouvements réflexes oculomoteurs sont trop forts et interdisent toute imagerie fonctionnelle s'ils ne sont pas totalement inhibés, car un blocage mécanique ne suffit pas. Dans la suite, il pourrait être judicieux de déterminer un procédé permettant une paralysie locale efficace et aisément réversible des mouvements oculomoteurs afin de réaliser cette imagerie. Cette imagerie pourra être couplée avec une imagerie vasculaire tomographique comme celle proposée par Demené (Demené et al., 2015) et une imagerie fUS en trois dimensions comme celle proposée dans le chapitre suivant.

Nous avons également vu qu'il n'était pas nécessaire de travailler sur un modèle animal aussi complexe que le primate non-humain. Et que pour une étude préliminaire, le rat était un modèle satisfaisant. Pour ce faire, nous avons développé une séquence d'imagerie fonctionnelle par ultrasons adaptée à une sonde échographique centrée à

30 MHz. Les résultats sont encourageants, nous observons des augmentations du CBV lors des périodes de stimulation. En effet les mouvements réflexes oculomoteurs semblent bien moins forts que chez le primate. Il reste toutefois une faible probabilité qu'ils soient toujours présents en l'absence de paralysie. Aussi, avant d'envisager un jour de nouvelles expérimentations sur primate, il sera peut-être nécessaire de réaliser cette imagerie sur le rat sans cette dernière ambiguïté. Ceci impose une recherche du bon paralytique ainsi qu'une normalisation du placement de la sonde et de la stimulation lumineuse. En effet, au cours de cette étude sur les rats, la sonde était placée manuellement sur l'œil avant d'être fixée. Le placement est donc peu reproductible. De plus, le prototype de sonde que nous avons utilisé est relativement imposant en comparaison de l'œil du rat et de l'encombrement autour de celui-ci. Ainsi, la diode délivrant le stimulus lumineux est placée dans l'espace restant sans réelle garantie qu'elle stimule la rétine de façon homogène. Ainsi, à l'avenir, la motorisation d'une sonde 30 MHz plus petite sera profitable à cette étude. Ceci permettra également de délivrer des stimuli plus précis.

Par ailleurs, maintenant que nous avons implémenté l'imagerie fonctionnelle à ces fréquences avec le procédé de *Multiplane Wave*, nous pourrons l'appliquer à d'autres études nécessitant cette résolution couplée à une bonne profondeur d'imagerie. Comme une étude précise du cortex du rat ou du cerveau de la souris.

2.5. Bibliographie

- Demené, C., Tiran, E., Sieu, L.A., Bergel, A., Gennisson, J.L., Pernot, M., Deffieux, T., Cohen, I., Tanter, M., 2015. 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. *Neuroimage* 127, 472–483. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.11.014
- Duong, T.Q., Ngan, S.C., Ugurbil, K., Kim, S.G., 2002. Functional magnetic resonance imaging of the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1176–1181.
- La Garza, B.H. De, Muir, E.R., Li, G., Shih, Y.Y.I., Duong, T.Q., 2011. Blood oxygenation level-dependent (BOLD) functional MRI of visual stimulation in the rat retina at 11.7 T. *NMR Biomed.* 24, 188–193. doi:10.1002/nbm.1571
- Macé, E., Montaldo, G., Osmanski, B.-F., Cohen, I., Fink, M., Tanter, M., 2013. Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 60, 492–506. doi:10.1109/TUFFC.2013.2592
- Michelson, G., Patzelt, A., Harazny, J., 2002. Flickering light increases retinal blood flow. *Retina* 22, 336–343. doi:10.1097/00006982-200206000-00013
- Newman, E.A., 2013. Functional Hyperemia and Mechanisms of Neurovascular Coupling in the Retinal Vasculature. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1685–1695. doi:10.1038/jcbfm.2013.145
- Riva, C.E., Harino, S., Shonat, R.D., Petrig, B.L., 1991. Flicker evoked increase in optic nerve head blood flow in anesthetized cats. *Neurosci. Lett.* 128, 291–296. doi:https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90282-X
- Riva, C.E., Logean, E., Falsini, B., 2005. Visually evoked hemodynamical response and assessment of neurovascular coupling in the optic nerve and retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 183–215. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.07.002

- Riva, C.E., Logean, E., Falsini, B., 2004. Temporal dynamics and magnitude of the blood flow response at the optic disk in normal subjects during functional retinal flicker-stimulation. *Neurosci. Lett.* 356, 75–78. doi:10.1016/j.neulet.2003.08.069
- Tiran, E., Deffieux, T., Correia, M., Maresca, D., Osmanski, B.-F., Sieu, L.-A., Bergel, A., Cohen, I., Pernot, M., Tanter, M., 2015. Multiplane wave imaging increases signal-to-noise ratio in ultrafast ultrasound imaging. *Phys. Med. Biol.* 60, 8549–8566. doi:10.1088/0031-9155/60/21/8549

3. Suivre le traitement primaire de l'information visuelle par les ultrasons fonctionnels

Après avoir étudié la rétine, continuons le chemin de l'information visuelle. Dans ce chapitre nous allons nous intéresser aux fonctions « primaires » du traitement visuel dans le cerveau, *i.e.* les Corps Géniculés Latéraux (LGN), le Colliculus Supérieur (SC) et le Cortex Visuel qui traitent l'information visuelle au niveau sensoriel.

Nous commencerons par cartographier ces zones dans le cerveau puis présenterons quelques-unes de leurs caractéristiques spatio-temporelles. Finalement, les outils mis au point pour ces études nous serviront à démontrer l'efficacité de deux méthodes de restauration visuelle.

3.1. Matériel et Méthodes

Commençons par présenter les principaux outils développés au cours de cette thèse afin de réaliser l'imagerie des fonctions visuelles du petit animal.

3.1.1. Modèle animal

Pour tout ce chapitre, le modèle animal utilisé est le rat. Bien que la vision des rongeurs ne soit pas aussi développée que celle des primates, ils constituent un modèle animal simple à étudier. De plus, nous verrons que la forme allongée de leur cerveau et de leur crâne facilite notre étude, particulièrement lorsqu'il s'agira de réaliser une imagerie 3D.

Sauf mention contraire, les animaux utilisés sont des mâles de la souche Long-Evans fournis par Janvier Labs (France), pesant entre 250 g et 350 g et âgés de 7 à 9 semaines. Hébergés à deux par cage, avec eau et nourriture en libre accès, ils sont maintenus dans des conditions standards (cycles jour/nuit de 12/12 h à une température de 22°C). Nos expériences ont été conduites en respectant les directives européennes (2010/63/EU) et le protocole expérimental approuvé par le Comité Régional d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale (CREEA) n°5 (dossier n°5486).

La séance d'imagerie et la chirurgie qui la précède sont faites sous anesthésie. L'animal est d'abord endormi par inhalation d'isoflurane à 5% puis par une injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine (60 mg/kg, Imalgene 1000®, Merial ; France) et de médétomidine (0,4 mg/kg, Domitor®, Pfizer Santé Animal ; France). L'anesthésie est ensuite maintenue en réinjectant cette solution à 1/3 de la dose initiale toutes les 45 minutes. De la buprenorphine est également injectée en sous-cutané (0,05 mg/kg, Buprecare®). L'animal est ensuite placé dans un cadre stéréotaxique. Sa température est maintenue à 37°C avec un tapis et une couverture chauffante tout au long de la séance.

La chirurgie commence par une incision sagittale du scalp pour dégager le crâne. Une fenêtre rectangulaire est ensuite fraisée dans l'os pariétal afin d'exposer le cerveau de Bregma -4 mm à Bregma -7 mm avec une ouverture latérale de 14 mm.

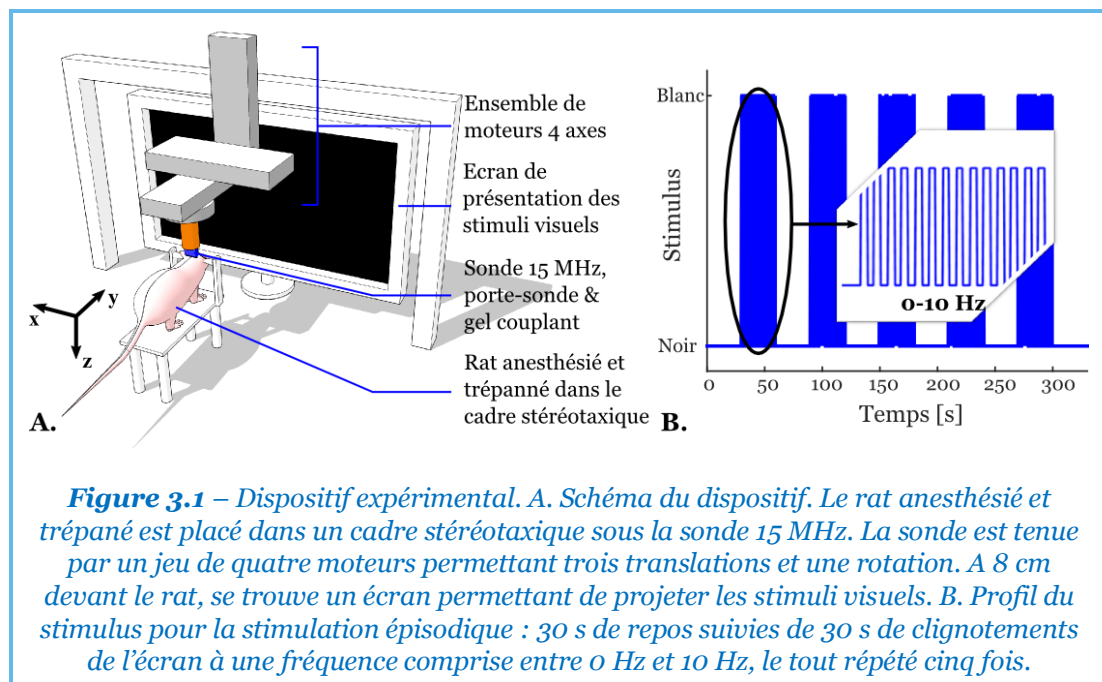
Tout au long de la chirurgie puis pendant les périodes de repos durant la séance d'imagerie, l'animal est maintenu dans le noir. On peut donc considérer qu'il s'est ainsi adapté à l'obscurité et sera plus sensible aux stimuli lumineux.

3.1.2. Stimulation visuelle

L'animal anesthésié, dans le cadre stéréotaxique, est ensuite amené sur le poste d'expérimentation. Il est placé face à un écran de 51 x 29 cm², de 1920 x 1080 pixels (P2314H 23", Dell), à 8 cm de celui-ci, de sorte que l'écran couvre 145° de son champ visuel horizontal et environ 122° en vertical. Dans ces conditions, la luminance maximum à 8 cm lorsque l'écran est complètement blanc est de 8 cd/m² et est au minimum de 0,04 cd/m² lorsque l'écran est noir. Le dispositif est présenté sur la

Figure 3.1. Cet écran est commandé par le logiciel Matlab® (Psychtoolbox-3, Mathworks, Natick, Massachusetts, USA) ce qui nous permettra plus tard de changer aisément de stimulus.

Dans un premier temps, nous utilisons un paradigme de stimulation épisodique, *i.e.* avec des périodes de repos entrecoupant les périodes de stimulation. Le stimulus choisi est le plus simple possible : l'alternance entre un écran complètement blanc et un écran complètement noir à une fréquence comprise entre 0 Hz et 10 Hz. Une session de stimulation consiste en 30 s de repos suivies de 30 s de stimulus, le tout répété cinq fois puis suivi de 30 s de repos pour finir, pour une durée totale de 330 s (voir **Figure 3.1B**). Entre chaque session de stimulation, le rat est gardé dans un environnement obscur.



3.1.3. Séquence fUS

Une sonde échographique centrée à 15 MHz (128 éléments, pas 110 μm , focale en élévation 8 mm, Vermon ; Tours, France), pilotée par un échographe ultrarapide (Aixplorer, Supersonic Imagine ; Aix-en-Provence, France), est placée sur le cerveau au-dessus d'une zone d'intérêt. Puis, de même que nous l'expliquions en 1.4.4, nous exécutons une séquence d'imagerie fUS pendant les 330 s que dure la session de stimulation. Cette séquence produit 1 image CBV par seconde. Chaque image CBV est le fruit de 200 images échographiques acquises en 400 ms (soit deux cycles cardiaques du rat) à la cadence de 500 images par seconde. Chacune de ces images est le résultat de la somme cohérente de 11 images en ondes planes acquises à la vitesse (ou *Pulse Repetition Frequency*, PRF) de 25 kHz avec un angle d'émission différent allant de de -10° à 10° , avec un pas de 2° .

Après les 5 minutes et 30 secondes d'acquisition, nous avons finalement, 330 images CBV de $14,08 \times 8 \text{ mm}^2$ avec 128×78 pixels pour une résolution de $110 \times 100 \mu\text{m}^2$.

Après calcul de la carte de corrélation avec le profil de stimulus, nous estimons que les pixels sont significatifs s'ils sont supérieurs à 3 fois l'écart-type du bruit de corrélation mesuré dans une zone cérébrale ne participant pas à la vision d'après l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos and Watson, 2007).

3.1.4. Déplacements motorisés de la sonde et imagerie fUS en 3D

La sonde échographique est montée sur un jeu de quatre moteurs (trois VT-80 Pollux et un DT-80 Pollux, PI Micos ; Allemagne), permettant trois translations selon les axes x , y et z de notre système (voir **Figure 3.1A**) et une rotation de la sonde autour de l'axe z . Ce système, déjà utilisé pour réaliser une imagerie vasculaire tomographique dans (Demené et al., 2015), nous permettra dans un premier temps de positionner aisément notre plan d'imagerie dans une zone d'intérêt du cerveau du rat, puis dans un second temps de réaliser une imagerie fonctionnelle en trois dimensions des fonctions visuelles du rat.

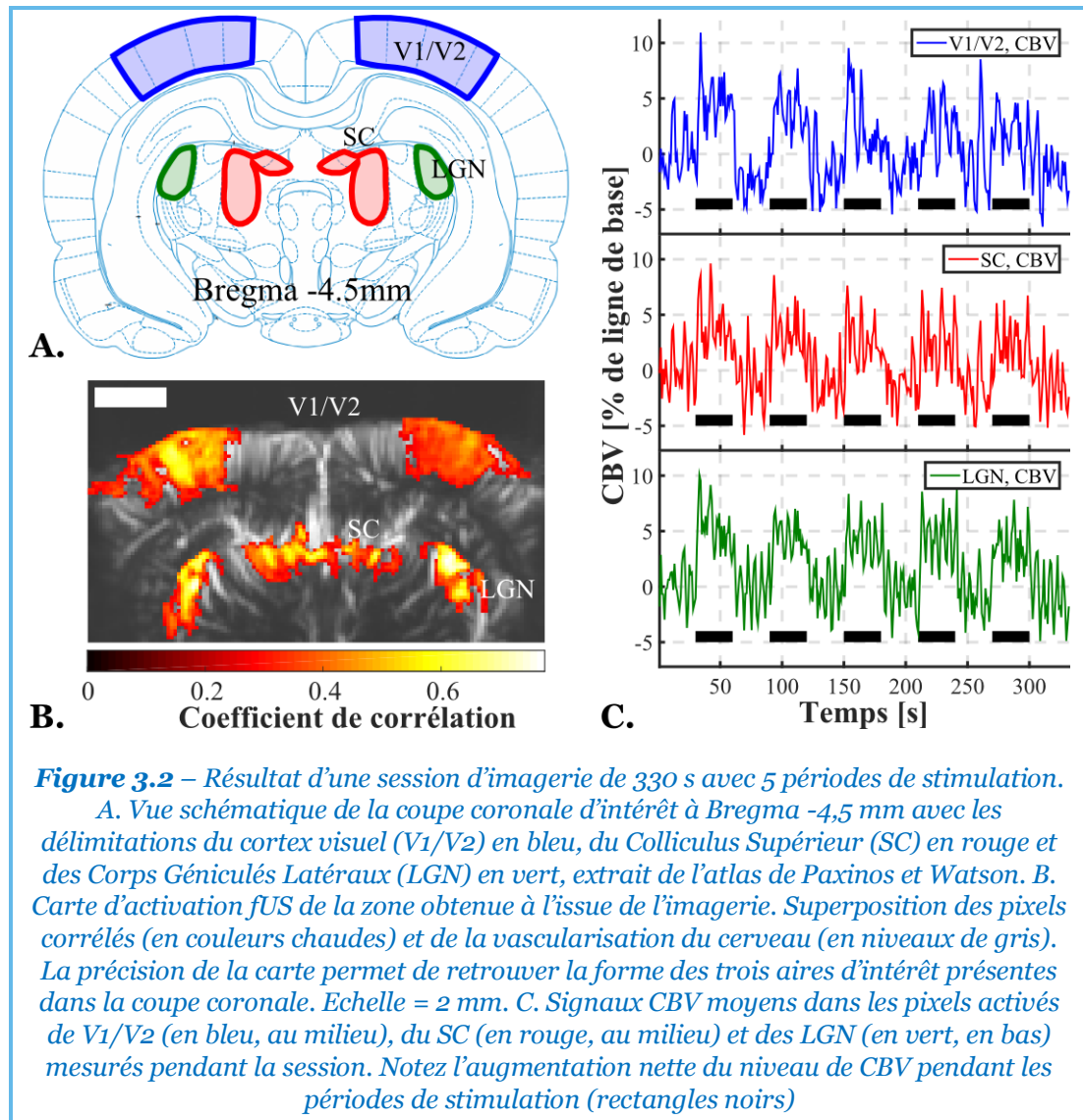
3.2. Résultats

3.2.1. Réponse à un stimulus simple dans un plan de coupe coronal

Pour commencer, la sonde est placée au-dessus de la coupe coronale Bregma -4,5 mm qui a l'avantage de présenter les trois aires visuelles d'intérêt présentées en 1.1 : le cortex visuel (V1/V2), le Colliculus Supérieur (SC) et les Corps Géniculés Latéraux (LGN) (voir **Figure 3.2A**). Une session d'imagerie fUS de cinq stimuli est réalisée. La fréquence des clignotements utilisée est de 3 Hz. La **Figure 3.2** présente le résultat de cette session.

Après corrélation avec le profil de stimulation et seuillage du bruit de corrélation, nous obtenons une carte d'activation (**Figure 3.2B**) qui correspond bien aux aires visuelles attendues. En faisant l'hypothèse que chaque groupe de pixels constitue effectivement ces aires, nous en extrayons les signaux CBV et pour chaque zone, nous pouvons tracer la courbe de CBV moyennée sur cette zone au cours du temps. On constate que dans les trois aires visuelles considérées, le CBV augmente pendant les stimuli (**Figure 3.2C**).

Forts de ce premier succès, nous avons pu pousser plus loin l'analyse de ces aires visuelles



3.2.2. Optimisation du stimulus

Dans un premier temps, nous conservons notre stimulus épisodique simple mais nous allons chercher à optimiser la réponse CBV qu'il provoque. Pour ce faire, nous faisons varier deux paramètres de notre stimulus :

- *La fréquence de clignotement* : définie comme la fréquence de l'alternance blanc/noir à l'écran pendant les 30 s de stimulus. Une fréquence de 0 Hz correspond à un écran blanc pendant 30 s.
- *Le contraste du clignotement* : défini comme le rapport de luminance de l'écran entre l'écran blanc et l'écran noir. Un contraste de 1 correspond donc au blanc le plus brillant et au noir le plus sombre que nous puissions obtenir avec notre matériel, tandis qu'un contraste de 0 correspond à un écran constant à 50% de gris.

Seuls ces deux paramètres de stimulation ont été modifiés pour cette étude.

3.2.2.1. Influence des paramètres de stimulation

Commençons avec une étude sur deux rats (#1 et #2), un pour l'étude de chaque paramètre. La sonde est placée au-dessus de la coupe coronale Bregma -5 mm et on y répète notre séquence fUS de 330 s en testant une valeur de paramètre à chaque fois (par exemple, pendant 330 s, des clignotements à 5 Hz avec un contraste de 1, entrecoupés de 30 s de repos à l'obscurité). Les différentes valeurs des paramètres sont testées cinq fois chacune, le tout dans un ordre aléatoire. Pour chaque session, on calcule la carte d'activation fUS en post-traitement et on en extrait la valeur du maximum de corrélation obtenue dans le cortex visuel (V1/V2) et celle obtenue dans le Colliculus Supérieur (SC) qui nous servent à quantifier la force de la réponse induite.

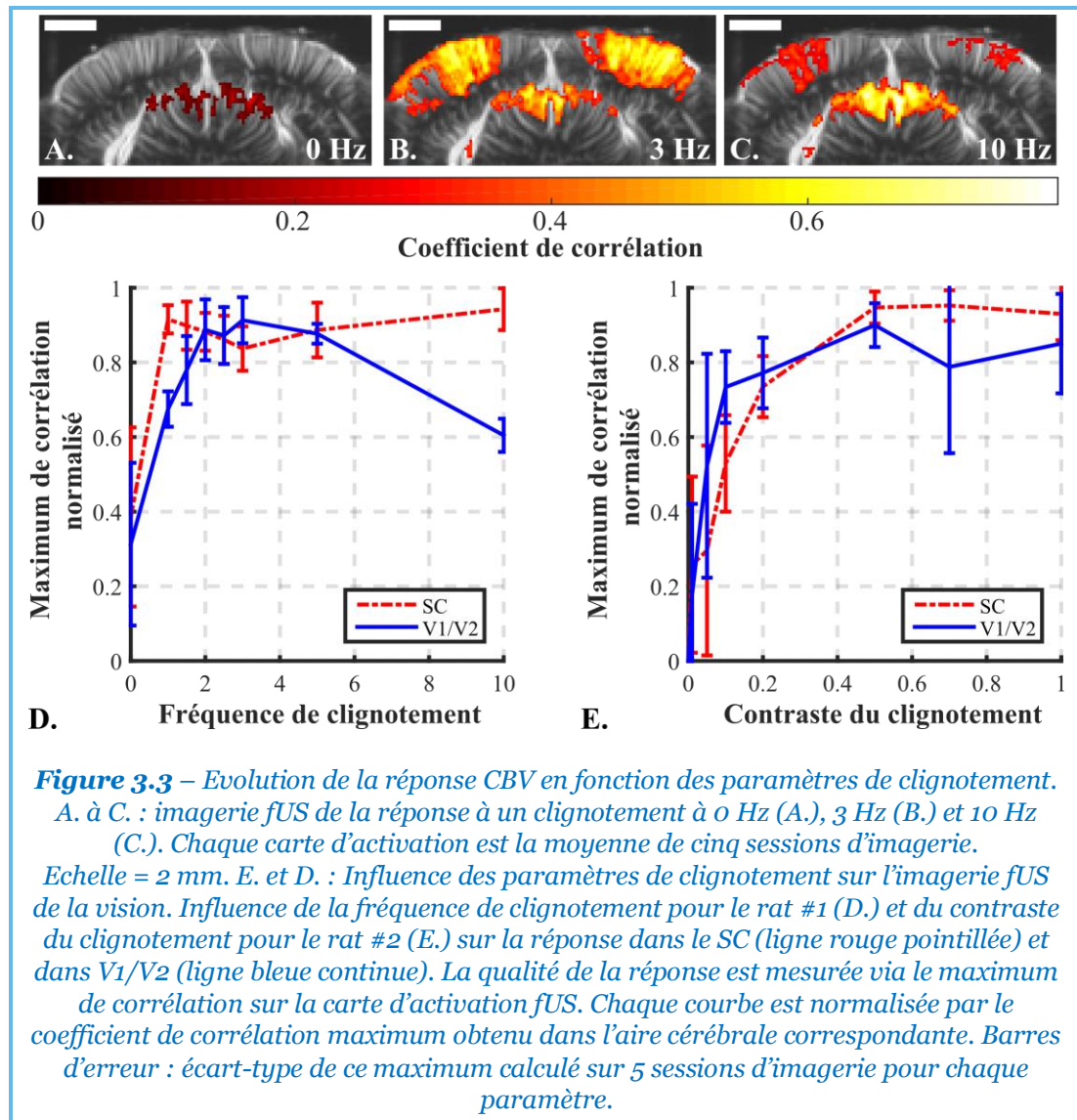
3.2.2.1.1. Fréquence du clignotement

On s'attend raisonnablement à ce qu'un contraste de 1 produise la plus forte réponse. C'est pourquoi, nous commençons par étudier l'influence de la fréquence de clignotement en fixant le contraste de l'écran à 1. Nous testons ainsi 8 valeurs de fréquence différentes dans l'intervalle [0 ; 10 Hz] (Chaque paramètre étant testé 5 fois, nous procédons donc à $8 \times 5 = 40$ sessions d'imagerie à 5 stimuli).

Les **Figure 3.3A** à **C** illustrent l'évolution de la réponse des aires visuelles du rat à des fréquences de clignotement de 0 Hz, 3 Hz et 10 Hz et la **Figure 3.3D** résume cette évolution pour toutes les fréquences que nous avons testées. Dans le V1/V2, la réponse est faible à basse fréquence puis croît jusqu'à un maximum obtenu aux environs de 3 Hz puis la réponse décroît en augmentant la fréquence jusqu'à 10 Hz. En revanche, le SC montre un comportement singulièrement différent. On y atteint une forte réponse dès 1 Hz qui reste à peu près stable jusqu'à 10 Hz. Dans la suite, nous gardons donc une fréquence de clignotement de 3 Hz qui nous permettra d'avoir une réponse maximum dans le cortex, tout en assurant une réponse convenable dans le colliculus.

3.2.2.1.2. Contraste du clignotement

Cette fois, nous fixons la fréquence de clignotement à 3 Hz pour étudier les variations de la réponse fonctionnelle en fonction du contraste du clignotement pour 8 valeurs dans l'intervalle [0 ; 1]. La **Figure 3.3E** résume cette étude. Nous observons alors un comportement similaire pour les deux aires visuelles, qui est celui attendu intuitivement, *i.e.* la sensibilité au contraste atteint un maximum vers 0,5 puis reste stable jusqu'à 1.



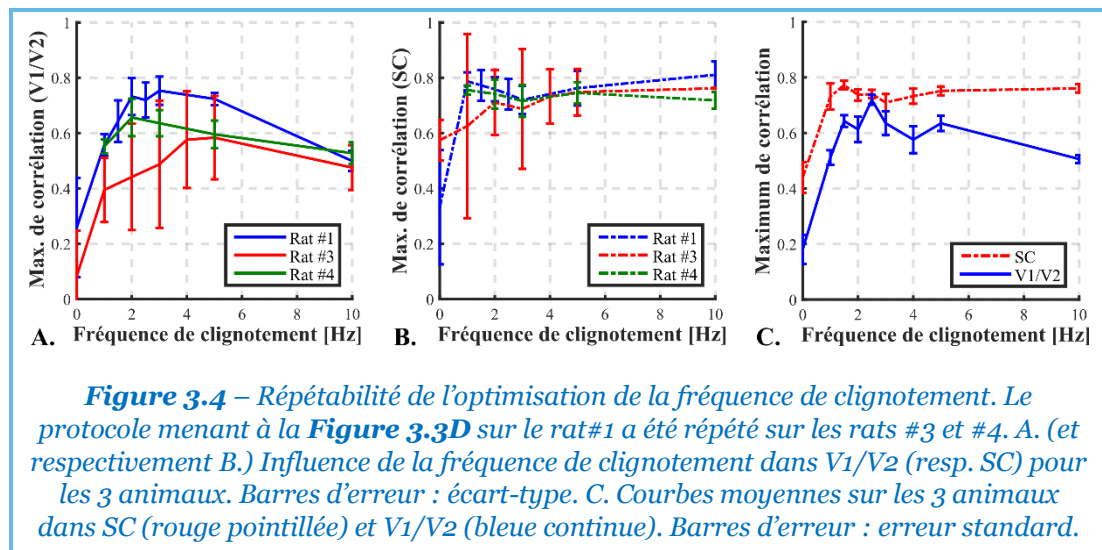
3.2.2.2. Répétabilité de la mesure de fréquence optimale

Pour l'instant, l'optimisation des paramètres n'a été faite que sur un rat pour chaque paramètre. Afin de pouvoir juger de la répétabilité de la mesure, nous avons répété le protocole d'optimisation de la fréquence de clignotement avec deux autres animaux (rats #3 et #4). Le résultat est présenté sur la **Figure 3.4**. Pour aller plus vite, nous avons testé moins de valeurs de fréquence et sur seulement 4 sessions d'imagerie plutôt que 5. Sur les **Figure 3.4A** et **B**, on constate que, malgré certaines variations individuelles, les profils des courbes de réponses de V1/V2 et du SC en fonction de la fréquence sont similaires d'un animal à l'autre. Ce qui nous permet par la suite d'utiliser une fréquence de clignotement de 3 Hz et un contraste de 1 et d'espérer être proche du maximum de sensibilité de l'animal utilisé.

En outre, ces comportements sont connus et ont déjà été documentés. En effet quelques études en IRMf (Bailey et al., 2013; Pawela et al., 2009) montrent également un maximum de réponse fonctionnelle aux environs de 3 Hz. De plus, cette sensibilité maximale pour une stimulation à ces fréquences semble un phénomène généralisable

à d'autres stimuli sensoriels et particulièrement aux stimuli tactiles (Ngai et al., 1999; Renema et al., 2007).

Enfin, nous avons fait le choix de ne pas répéter le protocole d'optimisation du contraste du clignotement. En effet, le phénomène de saturation au-delà de 0,5, plus intuitif, était également attendu et est déjà documenté (Albrecht and Hamilton, 1982; Lund et al., 1999). Sacrifier deux animaux supplémentaires pour cette étude n'est pas nécessaire.



3.2.3. Explorer le système visuel avec un stimulus simple

Ayant trouvé des paramètres de stimulation qui nous permettent d'avoir une réponse de qualité dans nos aires visuelles d'intérêt, nous nous en sommes servi pour explorer certaines caractéristiques du système visuel du rat.

3.2.3.1. Imagerie fUS en 3D du système visuel

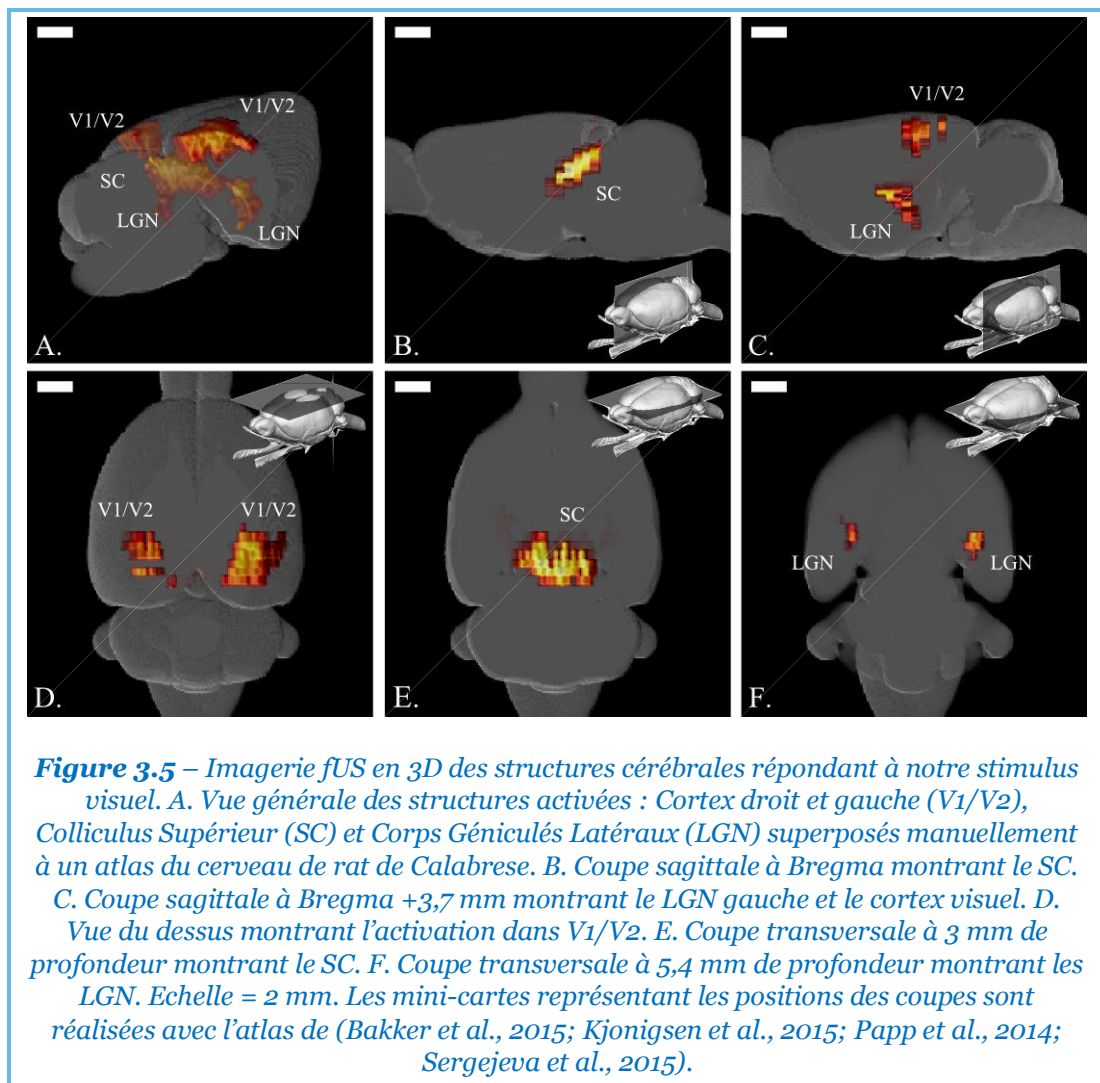
Maintenant que nous avons défini un protocole expérimental assez stable, nous l'avons adapté dans le but de réaliser une imagerie en trois dimensions du système visuel. En effet, avec notre sonde ultrasonore nous ne pouvons réaliser qu'une imagerie 2D. Or, les aires visuelles que nous étudions ici forment une structure en 3D qui ne peut pas être imagée en une seule fois.

Afin d'imager la totalité des zones d'intérêt, la craniotomie est élargie, et s'étend de Bregma +2 mm à Bregma -8 mm. Pour imagier cette zone, nous optons pour une stratégie simple : nous exécutons une séquence d'imagerie de 330 s, couplée au stimulus visuel comme décrit en 3.1.2 et 3.1.3 dans un plan d'imagerie coronal, puis, à l'aide du jeu de moteurs, la sonde est déplacée avant de répéter la séquence dans un nouveau plan d'imagerie coronal et ainsi de suite. Nous choisissons d'espacer ces plans d'imagerie de 500 μ m. Ce qui correspond approximativement à l'épaisseur du plan d'imagerie formé par la focalisation en élévation de notre sonde. Ainsi, 500 μ m est le

plus gros pas que nous pouvons faire sans perte d'information et en limitant les redondances. La taille des voxels ainsi obtenus est $110 \times 500 \times 100 \mu\text{m}^3$.

Ainsi, avec ce protocole nous imageons un rat de Bregma -3 mm à Bregma -8 mm. 11 plans d'imagerie étant nécessaires pour réaliser cette mesure, la totalité de la séquence d'imagerie dure donc $11 \times 330 \text{ s} = 1 \text{ h } 30 \text{ s}$, et l'animal doit être ré-anesthésié juste avant la séquence puis juste après (dans les cas où on prolonge la séance par d'autres imageries).

La **Figure 3.5** présente le résultat de cette imagerie fUS en 3D. Le volume fonctionnel est reconnaissable, avec les formes du cortex visuel au-dessus du colliculus supérieur et des corps géniculés latéraux.



3.2.3.2. Mesure de délais de réponse CBV entre les différentes structures

Dans cette étude, nous profitons d'avoir trois aires cérébrales répondant à notre stimulus pour nous intéresser aux délais de réponse entre celles-ci.

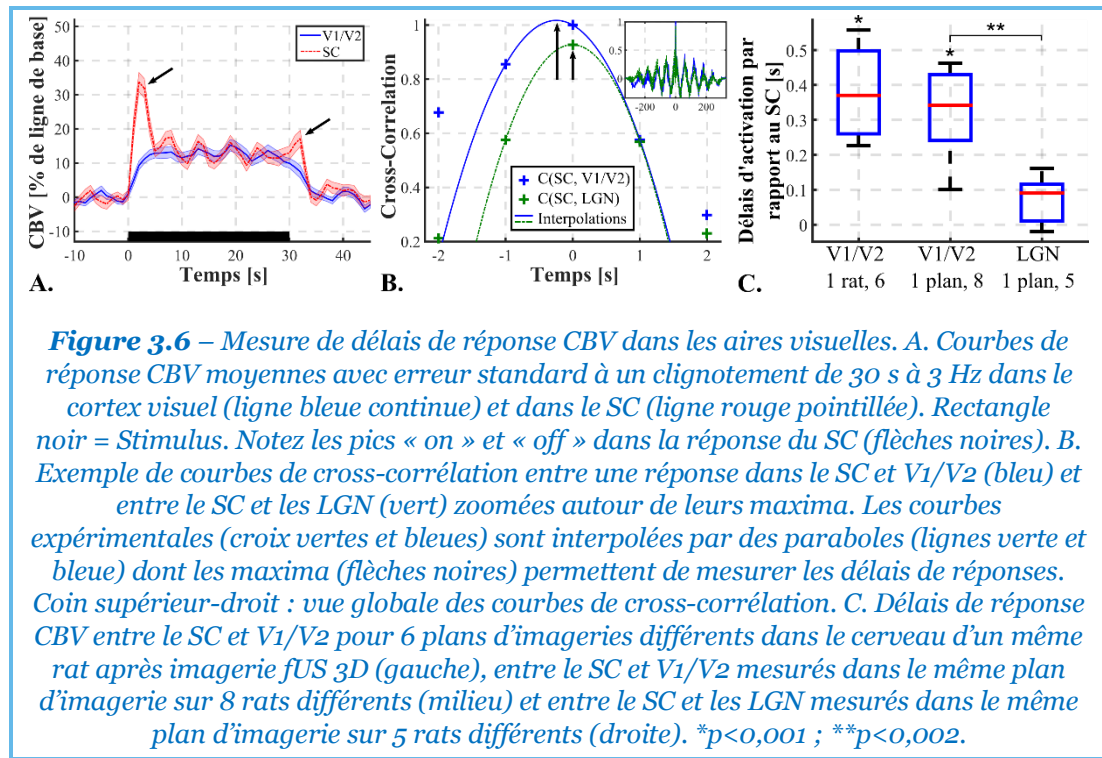
Dans un premier temps, on peut regarder la forme de la courbe de réponse CBV. La **Figure 3.6A** présente les courbes de réponse moyennes dans le cortex visuel et dans le colliculus supérieur après 30 stimuli de 30 s (fréquence de clignotement de 3 Hz). On y observe que les deux réponses n'ont pas tout à fait la même forme, et que la réponse dans le SC présente des pics « on » et « off » au début et à la fin du stimulus (Fukuda and Iwama, 1978; Van Camp et al., 2006; Wang et al., 2010). De plus, la réponse dans le cortex visuel semble être plus lente.

Pour quantifier un délai entre deux signaux numériques semblables, il est possible de calculer l'inter-corrélation de ces signaux qui présentera un maximum. La position de ce maximum permet de quantifier ce délai. Pour plus de précision, on peut interpoler le sommet de cette courbe par l'unique parabole passant par son maximum et les deux points voisins (**Figure 3.6B**). La position du sommet de cette parabole donne alors une estimation non-biaisée du délai entre nos deux signaux. Sous les bonnes hypothèses, il a été montré que la précision de cette méthode est, *in fine*, limitée par le rapport signal à bruit des signaux et peut être inférieure à 5% du temps d'échantillonnage (Carter, 1987; De Jong et al., 1990; Sandrin et al., 1999; Walker and Trahey, 1994). Nous allons donc procéder à cette mesure sur des signaux issus du cortex visuel, colliculus supérieur et LGN. Toutefois, le pic « off » de la réponse du colliculus pourrait allonger artificiellement cette réponse. C'est pourquoi avant la mesure, nous coupons la pente descendante de nos réponses et la remplaçons par la valeur moyenne du CBV sur la période de repos suivant cette descente.

Dans un premier temps, reprenons les données de l'imagerie fUS en 3D réalisée en 3.2.3.1. Dans 6 plans d'imagerie, il est possible d'isoler le cortex visuel et le colliculus supérieur. Ainsi, pour chacun de ces plans, nous prenons les signaux CBV moyens dans les pixels activés du colliculus et du cortex et procédons à la mesure du délai entre ces deux signaux, avec le signal du colliculus pour référence. On mesure ainsi une distribution de délais (présentée sur la **Figure 3.6C**, diagramme de gauche) montrant un retard moyen de 0,38 s de la réponse corticale par rapport à celle du colliculus, et significativement non-nul ($p < 0,001$, « two-tailed t-test »).

Poursuivons l'analyse en répétant la mesure sur plusieurs rats. Sur 8 rats, on réalise une imagerie fUS dans la coupe coronale Bregma -5,5 mm, contenant le V1/V2 et le SC et mesurons les délais des signaux obtenus à l'issue des 330 s d'imagerie. La distribution de délais obtenue (**Figure 3.6C**, diagramme au centre) est semblable à celle obtenue précédemment dans plusieurs coupes coronales d'un même rat : moyenne de 0,32 s de retard du cortex par rapport au colliculus, jugé significativement non-nul ($p < 0,001$, « two-tailed t-test »).

Finalement, nous répétons ce protocole sur 5 rats, mais imageons la coupe coronale Bregma -4,5 mm qui contient le SC et les LGN (et aussi V1/V2) et mesurons les délais de réponse CBV entre le SC et les LGN (**Figure 3.6C**, diagramme à droite). Cette fois, la distribution obtenue est significativement différente de celle pour le délai entre le SC et V1/V2 ($p < 0,002$, « two-tailed t-test »). En effet, les réponses CBV des LGN et du SC semblent être presque simultanées.



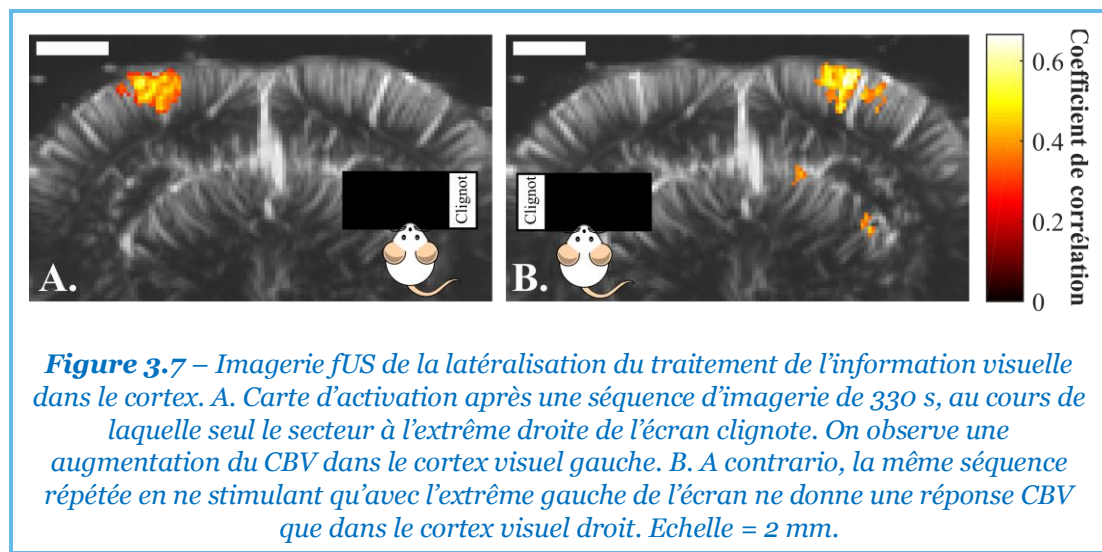
Bien qu'ils soient en adéquation avec les délais de réponse BOLD mesurés en IRMf (Yen et al., 2011), il faut rester prudent quant à l'interprétation des délais que nous mesurons ici. En effet, ils concernent les réponses hémodynamiques des aires visuelles. Ils ne sont donc pas à confondre avec les délais des réponses neuronales, mesurables en électrophysiologie, qui appartiennent à l'intervalle [10 ; 100 ms] (Saul and Feidler, 2002), et sont donc d'un autre ordre grandeur. De plus, les délais des réponses CBV peuvent tout autant être dus à un réel délai neuronal qu'à différentes dynamiques vasculaires ou de couplage neurovasculaire comme le suggèrent les études déjà publiées (Li and Freeman, 2007; Wibrat et al., 2007). Toutefois si l'origine de ces délais n'est pas encore clairement élucidée, ils pourraient constituer un biomarqueur intéressant pour le diagnostic, le suivi ou l'étude de certaines pathologies cérébrales comme les AVC (Siegel et al., 2016).

3.2.4. Explorer le système visuel avec des stimuli spatiotemporels complexes

Après avoir exploré le système visuel avec toujours le même stimulus, nous allons modifier un peu notre mode de stimulation pour explorer la spatialisation du traitement de l'information visuelle. Nous avons vu en 1.1.4 que ce traitement est organisé de façon rétinotopique, *i.e.* les neurones répondant à une stimulation venant d'une portion donnée du champ visuel sont situés juste à côté des neurones dont le champ récepteur couvre des portions adjacentes. Nous allons montrer comment nous pouvons reconstruire ce type de représentation topographique du champ visuel avec notre technique.

3.2.4.1. Latéralisation et réponse contra-latérale

Commençons par illustrer la latéralisation du traitement de l'information visuelle par une expérience simple : Nous réalisons une séance d'imagerie sur un rat, au cours de laquelle nous effectuons deux séquences d'imagerie fUS de 330 s à 5 stimuli clignotants. Mais plutôt que d'utiliser tout notre écran pour stimuler tout le champ visuel de l'animal, nous n'allons en stimuler qu'une partie. Pour la première séquence, seule une portion verticale à l'extrême droite de l'écran occupant 20% de sa surface clignote pendant les stimuli. Pendant la seconde séance, une portion équivalente de l'écran située à son extrême gauche clignote (voir **Figure 3.7**).

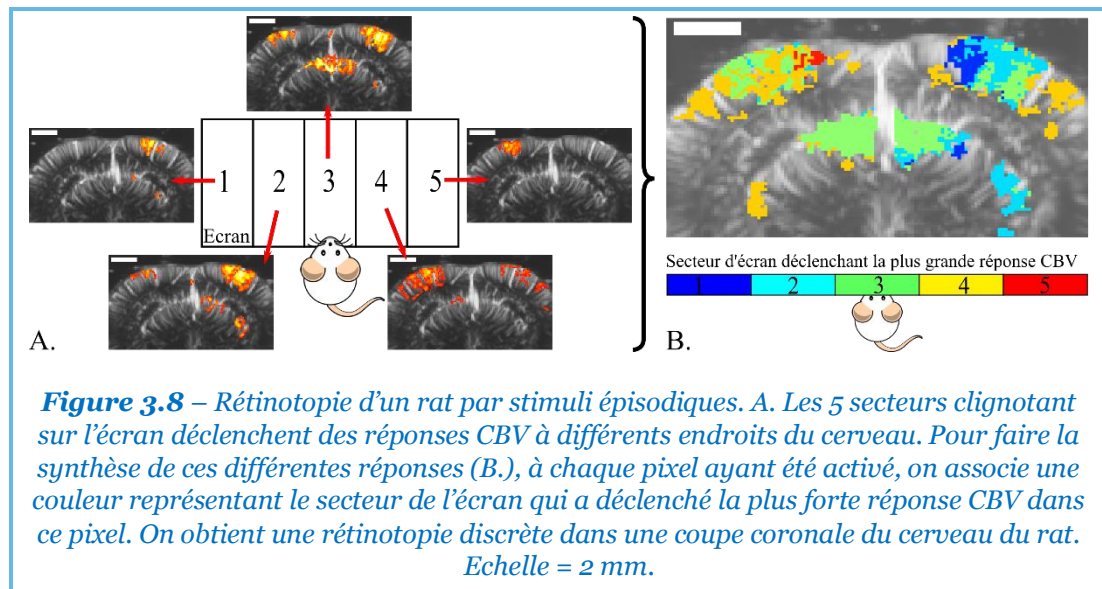


A l'issue de ces deux séquences d'imagerie, on observe (**Figure 3.7**) que le stimulus à droite provoque une réponse CBV dans le cortex visuel gauche et inversement. Par cette expérience simple, nous retrouvons, d'une part, un résultat bien connu sur la contra-latéralité du traitement de l'information visuelle mais, d'autre part nous vérifions que les augmentations de CBV observées au cours de nos expériences ne sont pas de simples artéfacts mais bien des augmentations de flux sanguins dues à des activités cérébrales.

3.2.4.2. Rétinotopie discrète avec un stimulus épisodique

Poussons le raisonnement un peu plus loin, et divisons l'écran en 5 secteurs de largeur égale (**Figure 3.8A**). On prépare un rat pour une séance d'imagerie et on place la sonde au-dessus de la coupe coronale Bregma -5 mm. On procède ensuite à des séquences d'imagerie fUS, mais à chaque séquence, on n'utilisera qu'un de ces secteurs pour stimuler le champ visuel (en clignotant à 3 Hz). Afin d'augmenter la qualité de la mesure, on répète chaque séquence de 330 s cinq fois. Et afin de limiter l'habituation, les 25 séquences d'imagerie sont exécutées dans un ordre aléatoire.

A l'issue des 2h30-3h d'imagerie, les 25 cartes d'activation fUS sont calculées. Puis, pour chaque secteur de stimulation, on calcule la courbe de réponse CBV moyenne dans chacun des pixels ayant répondu. Et enfin, pour chacun des pixels de l'image, on cherche quel secteur a déclenché la réponse CBV moyenne la plus forte. En associant une couleur à chaque secteur, on obtient la **Figure 3.8B** qui représente une rétinitopie discrétisée par notre choix de secteur.



La rétinitopie ainsi obtenue concorde avec ce qui est connu dans la littérature scientifique (Gias et al., 2005; Schuett et al., 2002). Toutefois, il y a deux inconvénients à cette première méthode :

- La carte obtenue est discrète. Avec l'hypothèse (vérifiée par ailleurs) qu'il y a homéomorphisme entre le champ visuel et sa projection dans le cerveau, on peut interpoler la carte obtenue. Mais cela restera une interpolation et non une vraie mesure.
- La mesure est longue (ici environ 2h30) et sera d'autant plus longue si on souhaite augmenter la précision de la rétinitopie en divisant l'écran en plus petits secteurs.

3.2.4.3. Rétinitopie « rapide » et continue avec un stimulus continu

3.2.4.3.1. Principe

Pour tenter de réaliser une rétinitopie plus rapidement et sans discrétisation de la carte, on peut s'inspirer d'une méthode utilisée dans (Kalatsky and Stryker, 2003; Vanni et al., 2010) dans le cas d'une rétinitopie en imagerie optique intrinsèque (voir 1.3.2.3. et **Figure 1.7**).

Cette fois, nous changeons fortement le stimulus utilisé. Il consiste maintenant en un écran noir traversé par une fine barre blanche verticale occupant 4° du champ visuel.

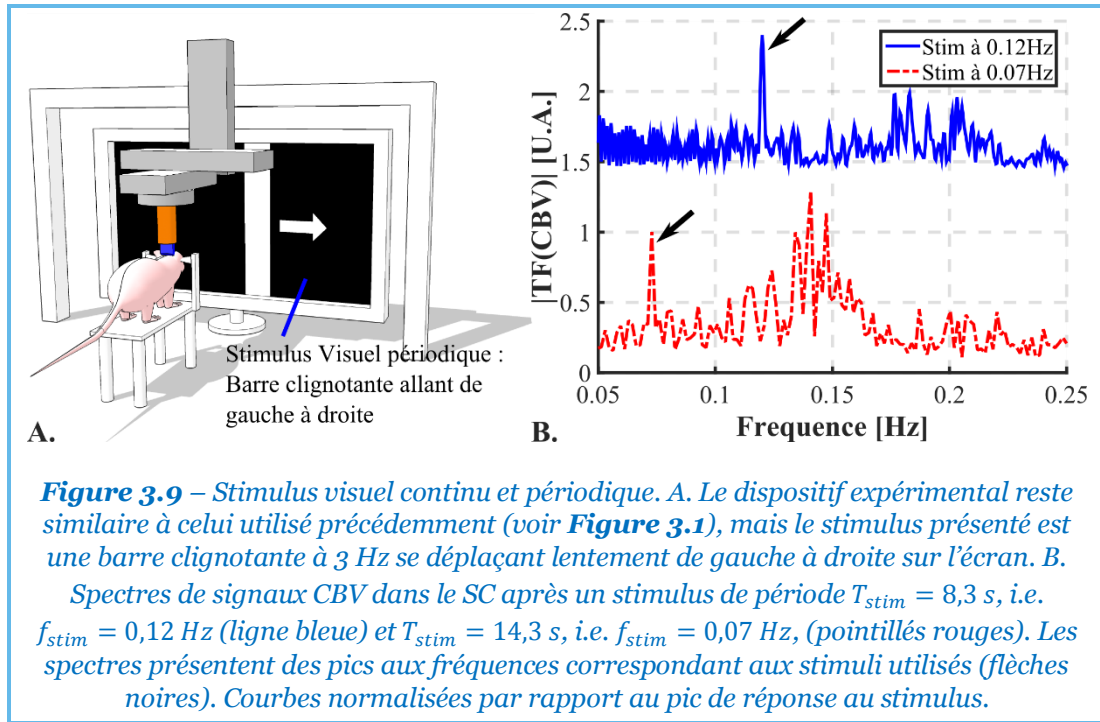
Cette barre clignote à 3 Hz et se déplace lentement de la gauche vers la droite sur l'écran. Sa vitesse est telle qu'elle parcourt tout l'écran en 8,3 s, puis recommence une traversée, toujours de gauche à droite, et ainsi de suite. Ce film est montré à un rat pendant 10 minutes. Le reste du dispositif est inchangé (**Figure 3.9A**). Dans un deuxième temps, nous montrons le même film mais avec une barre qui va dans l'autre sens (de droite à gauche). Et finalement, nous montrons des films avec une barre clignotante horizontale traversant l'écran de haut en bas puis de bas en haut, toujours en 8,3 s.

La sonde a été placée au-dessus de la coupe coronale Bregma -5,5 mm, dont nous savons maintenant qu'elle contient au moins deux aires visuelles que nous savons délimiter : le colliculus supérieur et le cortex visuel. Nous savons également que ces deux aires réagissent à un stimulus clignotant. Donc, notre barre clignotante doit activer ces zones lorsqu'elle se trouve dans les bonnes parties du champ de vision de l'animal, et ce, à chacune de ses traversées de l'écran. Ainsi la nature périodique de notre stimulus, devrait induire des signaux CBV de la même période ($T_{stim} = 8,3 s$) dans les aires visuelles.

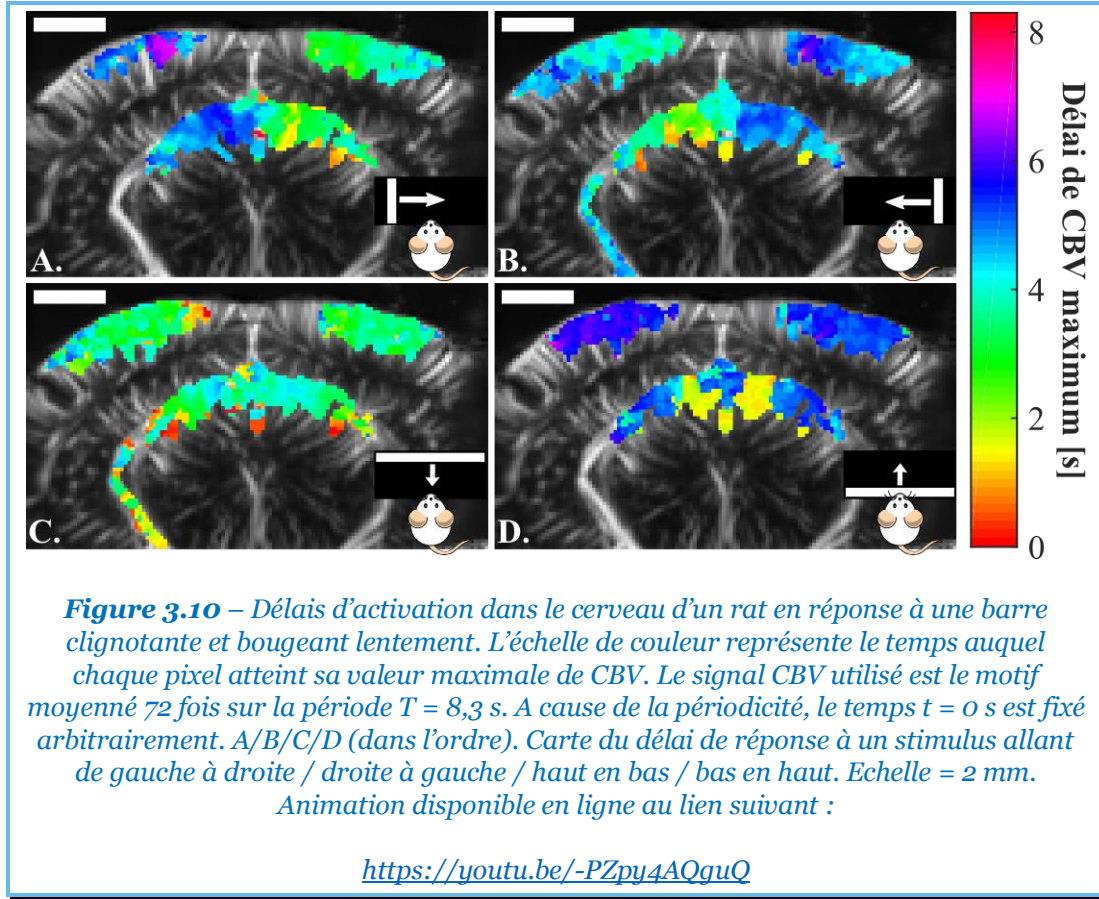
3.2.4.3.2. Résultats

Dans un premier temps, vérifions le postulat que notre stimulus périodique induit bien une réponse CBV périodique et de même période. Après la séquence d'imagerie, nous extrayons le signal CBV du Colliculus Supérieur (SC) et en traçons la transformée de Fourier (**Figure 3.9B**). Sur ce spectre, on observe bien un pic correspondant à la fréquence de passage de notre barre clignotante. Pour s'assurer que ce pic est bien une réponse à notre stimulus, on procède à une autre séance d'imagerie avec un stimulus se répétant avec une période plus longue ($T_{stim} = 14,3 s$). A l'issue de cette deuxième séance, le spectre obtenu présente bien un pic à la fréquence correspondant à cette période (courbe rouge pointillée).

Sur les spectres de réponse CBV, on observe également un massif aux environs de 0,15 Hz et 0,2 Hz. Ce massif dont l'intensité et la position fréquentielle sont variables (on a également rencontré des cas où il était absent) est lié à l'activité spontanée du cerveau, aussi appelée « *Resting State* » (Rosazza and Minati, 2011), et sera gênant pour notre mesure. Il faudra utiliser des fréquences de stimulation distinctes. En outre, on a également remarqué une forme de « résonance » du système vasculaire aux fréquences proches de ce massif. Si la fréquence utilisée en est trop éloignée, l'amplitude de la réponse CBV sera plus faible. L'usage nous fera utiliser une fréquence de stimulus de 0,12 Hz, assez proche du massif, tout est en restant aisément séparable.



On réalise ainsi quatre séquences d'imagerie de 10 minutes : avec une barre allant de gauche à droite, une barre allant de droite à gauche, de haut en bas, et de bas en haut. La réponse fonctionnelle ayant une périodicité de 8,3 s une façon simple d'extraire ce signal est, pour chaque pixel, de moyenner les 72 périodes pour obtenir le motif correspondant à cette période. Ainsi, il est possible de visualiser sur une animation (voir légende de la **Figure 3.10**) les variations de chaque pixel. Du fait de l'organisation rétinotopique, on observe des formes « d'ondes d'activité » se propageant dans le cerveau de l'animal allant dans des sens inverses suivant que la barre aille de gauche à droite, ou de droite à gauche (idem pour les mouvements verticaux). Sur la **Figure 3.10**, afin de visualiser cette « onde » on a représenté avec un code couleur, les temps auxquels les maxima du signal CBV moyen sont atteints pour chaque pixel. Toutefois, le signal CBV étant périodique, nous fixons arbitrairement une origine des temps. De plus les cartes présentées ici ne représentent pas encore des rétinotopies, mais juste un délai de réponse au passage d'un stimulus.



Pour aller plus loin, reprenons les données des séquences d'imagerie avec la barre allant de droite à gauche et de gauche à droite et adaptons encore plus loin la méthode proposée dans (Kalatsky and Stryker, 2003), en allant extraire la phase de chaque pixel CBV à la fréquence 0,12 Hz.

Considérons le signal CBV d'un pixel situé dans une aire visuelle. Dans le domaine de Fourier, ce signal se décompose classiquement en un module ($|\overline{CBV}(f)|$) présenté sur la **Figure 3.9B** et sensiblement identique pour tous les pixels des aires visuelles, et une phase $\varphi(f)$ sous la forme:

$$\overline{CBV}(f) = |\overline{CBV}(f)|e^{j\varphi(f)} \quad (3.1)$$

Or à la fréquence $f = f_{stim}$, la phase $\varphi(f = f_{stim}) = \varphi_{stim}$, est reliée au délai d'activation du pixel, Δt (par rapport au début du passage de la barre), par :

$$\varphi_{stim} = 2\pi f_{stim} \Delta t \quad (3.2)$$

Or si on trouve Δt , connaissant le trajet de la barre dans le champ visuel, on peut savoir quelle partie du cerveau a été activée par quelle position dans le champ visuel et ainsi reconstruire une rétino-topie.

Il faut toutefois prendre un compte un autre détail : le délai de couplage neurovasculaire. En effet, après un stimulus, il faut un temps de l'ordre de 1 s à 2 s pour que la réponse CBV soit maximale (voir **Figure 3.11A**). Notons la phase additionnelle inconnue résultante φ_d . Il en découle que la phase du signal CBV à $f = f_{stim}$ effectivement mesurée après 10 minutes de barre allant de gauche à droite sera en fait φ^+ :

$$\varphi^+ = \varphi_{stim} + \varphi_d \quad (3.3)$$

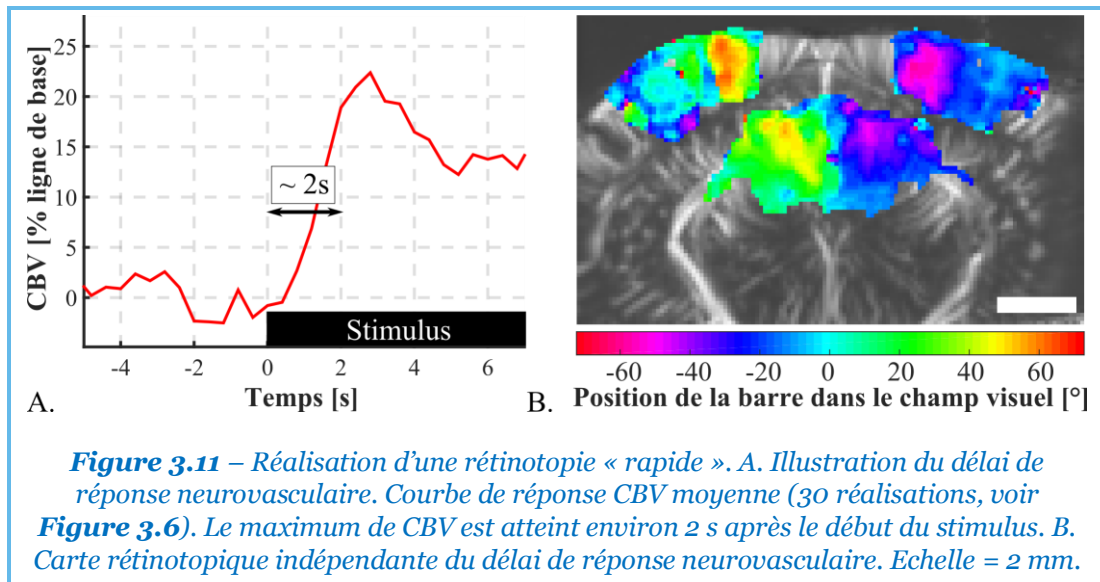
En revanche, si la barre fait exactement le trajet inverse (de droite à gauche), φ_d sera inchangée tandis que la phase liée au déplacement de la barre vaudra cette fois $-\varphi_{stim}$. Ainsi, à $f = f_{stim}$, on mesurera effectivement φ^- :

$$\varphi^- = -\varphi_{stim} + \varphi_d \quad (3.4)$$

Dès lors, soustraire les deux cartes de phase φ^+ et φ^- donne :

$$\varphi^+ - \varphi^- = 2\varphi_{stim} \quad (3.5)$$

Et permet de mesurer une carte de délais indépendants du délai de réponse neurovasculaire. Ces délais sont finalement reliés à la position de la barre de stimulation sur l'écran et donc dans le champ visuel de l'animal. On peut ainsi construire une rétino-topie présentée sur la **Figure 3.11B**.



Ainsi en deux séquences d'imagerie fUS de 10 minutes, on est capable de réaliser une carte rétino-topique des fonctions visuelles dans le cortex visuel et dans le colliculus supérieur dans un plan coronal, cohérente avec ce qu'on a vu sur la **Figure 3.8**, mais plus rapidement et sans discontinuité.

Enfin, notons que dans cette partie nous avons utilisé des stimuli « verticaux », car les rétinotopies du rat et de la souris réalisées en imagerie optique intrinsèque (Gias et al., 2005; Kalatsky and Stryker, 2003; Schuett et al., 2002) révèlent que cette géométrie sera plus favorable à notre imagerie dans un plan coronal car nos secteurs verticaux et barres verticales sur l'écran activent principalement des secteurs corticaux ayant une orientation globalement sagittale. On peut en avoir une confirmation par les cartes de délais **Figure 3.10C** et **D** obtenues avec la barre horizontale. Dans ce cas, on active des secteurs globalement coronaux dans le cortex. On ne voit donc à l'imagerie que celui qui coïncide avec notre plan d'imagerie et qui est donc activé avec un délai uniforme.

Par ailleurs, cette méthode est également proche des paradigmes de stimulation utilisés en IRMf pour réaliser des rétinotopies sur les humains. En effet, on fait regarder aux sujets des portions d'échiquier circulaires pouvant être un anneau grossissant et rapetissant ou un quartier de disque tournant au centre de l'image. Le premier permet de réaliser une rétinotopie en excentricité et le second une rétinotopie polaire et leur combinaison permet de réaliser une rétinotopie complète (Warnking et al., 2002).

3.2.5. Vers une analyse spectrale du fUS

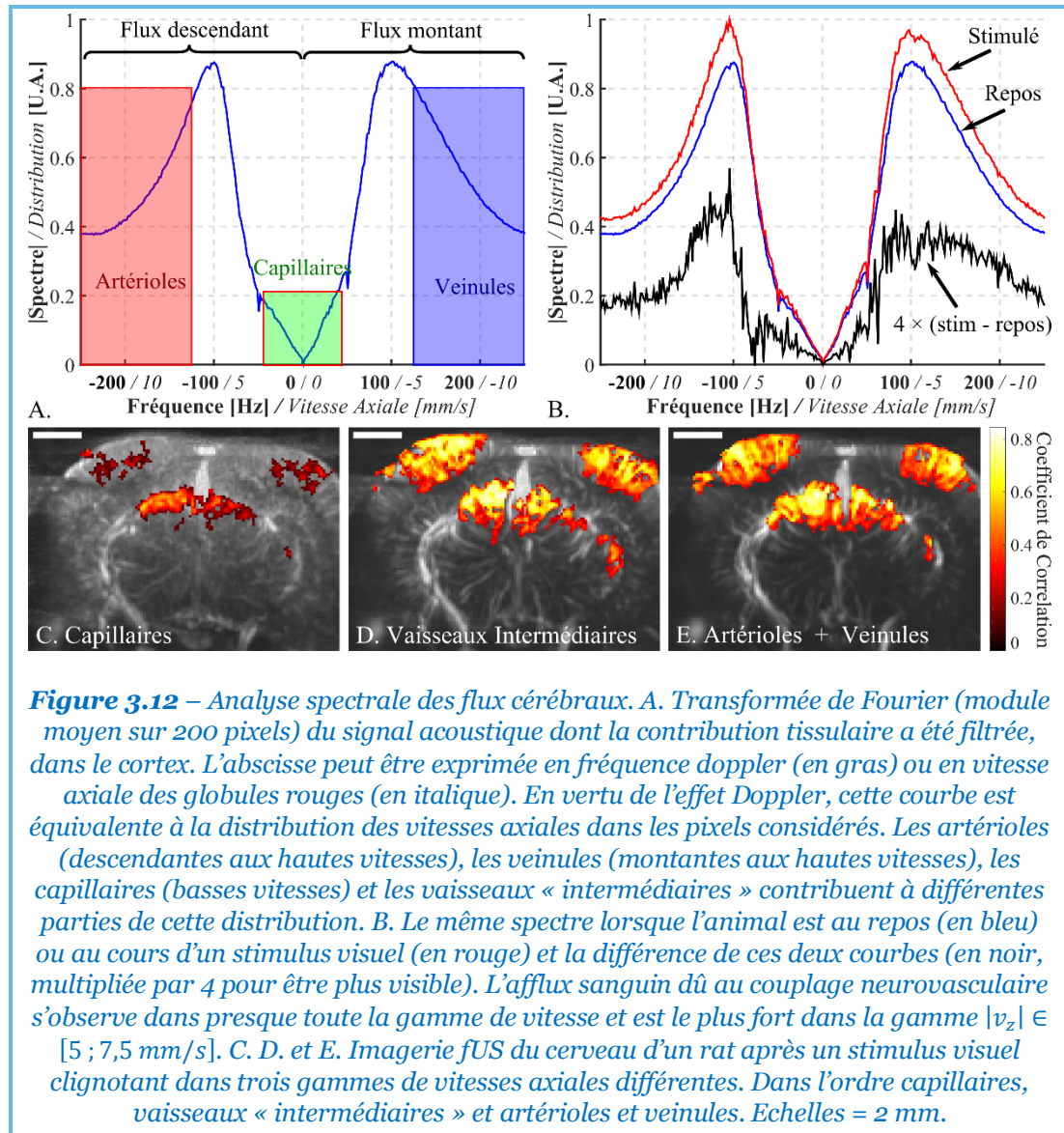
Penchons-nous à présent sur le signal CBV et sur ce qui le constitue, pour voir si nous pourrions en tirer d'autres informations pertinentes pour notre sujet.

3.2.5.1. Analyse spectrale, vitesses et architecture micro-vasculaire

Dans un premier temps, rappelons que pour faire une image CBV par seconde, nous acquérons à chaque fois, un bloc de 200 images ultrasonores à la vitesse de 500 images par seconde. Ce bloc est ensuite filtré par SVD pour ne garder que la contribution des réflecteurs présents dans le sang (majoritairement des globules rouges), puis sommé de façon incohérente (équations (1.2)(1.1), voir 1.4.3.2). Considérons un voisinage d'une centaine de pixels de ce bloc situé dans le cortex du rat après filtrage SVD, mais avant sommation. Si on extrait les signaux de ces pixels, qu'on en calcule les transformées de Fourier, qu'on recommence dans 100 autres blocs, et qu'on en trace le module moyen, on obtient alors une courbe présentée sur la **Figure 3.12A**. En vertu de l'effet Doppler et de l'équation (1.1), cette courbe représente également la distribution des vitesses axiales des diffuseurs présents dans les pixels considérés. Parmi ces vitesses, les plus grandes sont dues aux gros vaisseaux sanguins, artérioles et veinules, et les plus lentes, aux petits capillaires. On a vu en 1.3.2.1 que, dans le cortex, les artères descendent en profondeur. Ces flux descendants aboutissent à la partie négative de la distribution de fréquences, et inversement pour les veinules dont les flux sont montants.

Traçons maintenant la distribution de vitesses axiales dans les mêmes pixels mais en prenant des blocs de 200 images extraits de périodes de stimulation (**Figure 3.12B**). On observe une augmentation globale de la courbe de distribution, correspondant à

l'augmentation de CBV mesurée précédemment. On constate aussi que cette augmentation est plus importante dans la gamme $|v_z| \in [5 ; 7,5 \text{ mm/s}]$, qui est la partie de la distribution des vitesses qui contribue le plus à l'augmentation de CBV mesurée dans notre séquence fUS. On peut en conclure que l'augmentation de CBV que nous mesurons en fUS, n'est pas seulement due aux flux capillaires (plus proches des neurones) mais également aux flux artériolaires et veineux.



Pour compléter ces observations, on réalise l'imagerie fUS d'un rat ayant reçu un stimulus visuel clignotant. Mais cette fois, les cartes CBV utilisées pour détecter les augmentations de CBV ne contiennent que les contributions des capillaires, dans un premier temps, puis des vaisseaux « intermédiaires » montants et descendants dans un second temps, et enfin, les contributions combinées des artérioles et veinules. Les trois cartes d'activation fUS obtenues à l'issue de cette acquisition sont présentées **Figure 3.12C, D et E**. On peut observer deux choses sur ces cartes :

- Les cartes vasculaires CBV (en arrière-plan) sont différentes. En effet, lorsqu'elle ne contient que les contributions artériolaires et veineuses, on distingue nettement les vaisseaux sanguins. En revanche, lorsqu'on elle ne contient que les contributions capillaires au CBV, l'image semble plus floue. En effet, notre imagerie ne dispose pas de la résolution pour distinguer les capillaires qui sont trop petits et trop proches. Ainsi, au sein du même pixel, on peut mesurer les contributions de plusieurs capillaires.

L'activation mesurée est moins forte lorsqu'on ne considère que les capillaires. Cette observation rejoint ce que nous observons sur la **Figure 3.12B**. La différence de CBV entre les états au repos et activés est moins grande lorsqu'on ne considère que les variations du CBV capillaire.

Ici, le couplage neurovasculaire semble être faible dans les capillaires, alors que ce n'est pas le cas lorsqu'il est mesuré précisément par d'autres méthodes microscopiques (Hillman et al., 2007; Shih et al., 2012). On peut émettre deux hypothèses pour expliquer ceci.

- Ici, nous comparons le nombre de diffuseurs dans les « gros » vaisseaux par rapport à celui dans les capillaires. Or les capillaires ayant un diamètre bien plus petit (Shih et al., 2009) (parfois juste assez suffisant pour laisser passer un globule rouge), le nombre de diffuseurs qu'ils contiennent apparaît donc plus faible en comparaison, à cause de cette loi d'échelle. Toutefois, il a été estimé dans (Gould et al., 2016), que le volume total occupé par le sang dans les « gros » vaisseaux représente 45% du volume sanguin total micro-circulant. Cette première hypothèse ne suffit donc pas à expliquer le peu de signal que nous avons provenant des capillaires.
- Les diffuseurs présents dans les capillaires sont les plus lents (à partir de 2 mm/s à 1 mm/s jusqu'à des vitesses quasi-nulles (Gould et al., 2016; Hudetz, 1997). Ils sont donc plus difficilement séparés de la contribution tissulaire lors du filtrage SVD. Ainsi, c'est dans cette gamme de vitesse que le rapport signal à bruit de notre mesure est le plus faible.

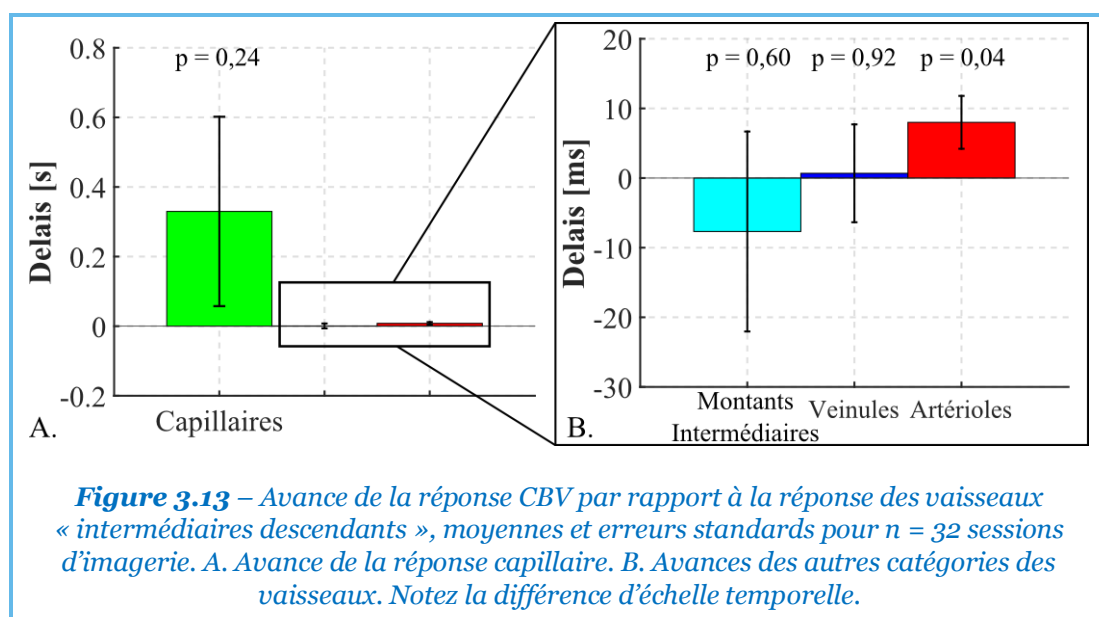
3.2.5.2. *Délais de réponse par taille de vaisseau*

A partir de ces signaux, nous procédons à une dernière analyse spectrale. Puisque toutes les gammes de vitesses (et donc de vaisseaux sanguins) participent à la réponse CBV, nous tâchons de mesurer si l'une d'entre elles y contribue en premier.

Pour produire cette analyse, reprenons le filtrage des données d'une session d'imagerie de 330 s. Pour chaque bloc de 200 images ultrasonores, nous intercalons une nouvelle étape de traitement entre le filtrage SVD et la somme incohérente. Cette étape consiste à passer le bloc de 200 images filtrées dans le domaine de Fourier et à découper le spectre obtenu en 5 parties sur les gammes [6 ; 12,5 mm/s], [-12,5 ; -6 mm/s], [-1 ; 1 mm/s], [2 ; 6 mm/s], et [-6 ; -2 mm/s] (les bandes de fréquences Doppler, identifiées sur la **Figure 3.12A**) et correspondant respectivement aux contributions des artérioles, veinules, capillaires et des vaisseaux montants et descendants « intermédiaires ». Puis ces 5 bouts de spectres sont sommés en puissance (équation

(1.2)) de sorte qu'on ait ainsi 5 films CBV, chacun montrant les variations CBV correspondant à la bande de vitesse choisie.

On produit ensuite une carte d'activation par film CBV et on extrait les signaux CBV moyens des pixels corrélés dans le cortex visuel. On a ainsi 5 signaux CBV montrant la réponse CBV des capillaires, artérioles, veinules, etc. Par la méthode de mesure de délais que nous avons explicitée en 3.2.3.2, nous mesurons les délais de réponse entre ces 5 signaux. On choisit arbitrairement comme référence le signal CBV correspondant aux vaisseaux intermédiaires descendants qui semble être le moins bruité. On produit ainsi un délai de réponse pour 4 de nos bandes de vitesses par rapport à la bande de référence. Les signaux étant assez bruités dans le cas des capillaires, nous répétons la mesure sur une cohorte de 32 sessions d'imagerie de 330 s réparties sur 6 animaux. Le résultat de cette étude est présenté sur la **Figure 3.13**.



Ce faisant, nous ne trouvons pas de délai de réponse important ou significatif entre les différentes catégories de vaisseaux. Toutefois, il pourrait y avoir une avance moyenne de 0,33 s (écart-type de 1,27 s) de la réponse capillaire sur les autres réponses. Cette réponse plus rapide des capillaires serait naturelle dans la mesure où ils sont au plus près des neurones et qu'ils participent les premiers au couplage neurovasculaire, ce qui est confirmé dans (Hillman et al., 2007). Il convient ici de rester très prudent car ce résultat est entaché d'une forte erreur de mesure, principalement due au faible rapport signal à bruit du signal CBV dans les capillaires.

Remarquons enfin que nous faisons cette analyse dans le cortex pour lequel l'architecture vasculaire est simple et bien documentée. Ce qui nous permet de séparer aisément les flux artériolaires des flux veineux et capillaires avec une simple hypothèse sur leurs orientations et vitesses axiales. Cette analyse deviendrait plus difficile à produire ailleurs dans le cerveau où nous n'avons pas d'information a priori sur la direction et la vitesse des flux sanguins.

3.2.6. Imagerie fUS et restauration visuelle

Après avoir exploré les capacités de l'imagerie fUS et exploré le système visuel du petit animal, nous avons terminé notre étude du petit animal par l'évaluation de deux techniques de restauration visuelle. Les implants rétiniens et l'optogénétique.

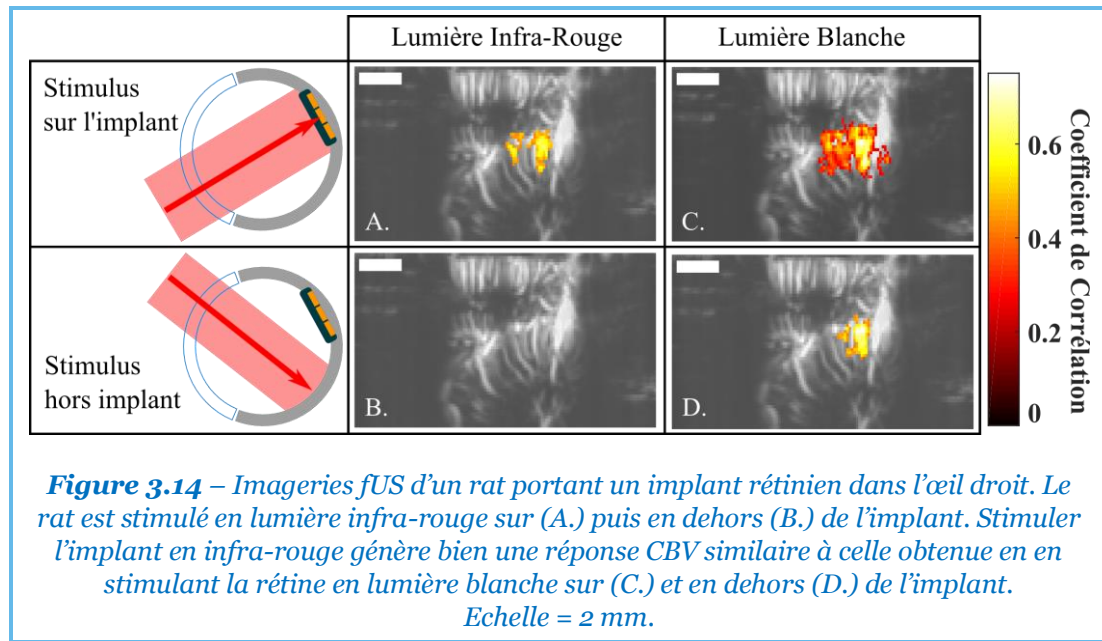
3.2.6.1. Implants rétiniens

Pour cette étude, un rat sain dont l'œil droit a reçu un des implants décrits en 1.2.1 va être imagé par ultrasons fonctionnels. Rappelons que ces implants sont sensibles aux infra-rouges. Ainsi, le principe de l'expérience présentée ici est simple : le rat est sain donc si on le stimule dans le visible on doit observer une réponse fUS. De plus, si on stimule son implant rétinien dans l'infra-rouge, on devrait observer une réponse fUS. En revanche, la rétine des rats n'étant naturellement pas sensible à ces longueurs d'onde, si on stimule le même œil en infra-rouge, mais à côté de l'implant, on ne doit pas observer de réponse CBV.

Pour cette étude, les craniotomies réalisées sont plus petites et n'exposent qu'un hémisphère cérébral. En effet, la greffe des implants rétiniens étant complexe, on préfère ne pas sacrifier les animaux à la fin de la séance d'imagerie. Pour ce faire, on remplace le crâne par un feuillet de TPX (ou PMP, polyméthylpentène), un polymère transparent aux ultrasons (Sieu et al., 2015). Les animaux ainsi greffés peuvent être réveillés à l'issue de la séance d'imagerie, gardés et participer à, au plus, une séance par semaine pendant plusieurs mois. La fenêtre crânienne est plus petite pour faciliter la pose de ce feuillet et limiter le risque de rejet. La zone pouvant être imagée est donc plus étroite (voir **Figure 3.14**).

Dans cette expérience, nous voulons stimuler précisément la rétine. C'est pourquoi nous n'utilisons pas l'écran de stimulation mais une lampe à fente modifiée. Ce dispositif d'ophtalmologie permet normalement d'observer (entre autres) le fond de l'œil des patients. La lampe à fente utilisée ici est couplée à un DMD (un réseau de micro-miroirs utilisé dans les projecteurs vidéo) afin de projeter n'importe quelle image au fond de la rétine, à l'endroit de notre choix. Ici, nous nous en servons pour éclairer précisément certaines zones de la rétine. Nous couplons ce dispositif à une lampe blanche ou à une diode laser Infra-Rouge, de longueur d'onde $\lambda = 880$ nm, à laquelle les implants rétiniens sont sensibles. Ainsi, nous testons quatre configurations différentes sur l'œil implanté d'un rat (œil droit). En éclairant en lumière infra-rouge sur et en dehors de l'implant, et en éclairant en lumière blanche sur et en dehors de l'implant.

La **Figure 3.14** résume les résultats de cette étude. On observe, comme attendu, qu'un stimulus en lumière blanche provoque une réponse dans le colliculus supérieur quelle que soit la zone de la rétine qu'on éclaire. Tandis qu'un stimulus en infra-rouge ne provoque une réponse que s'il est projeté sur l'implant. Ceci prouve que grâce aux implants, ces rats, ont retrouvé une forme de vision et constitue un résultat majeur pour l'ensemble du projet HELMHOLTZ.



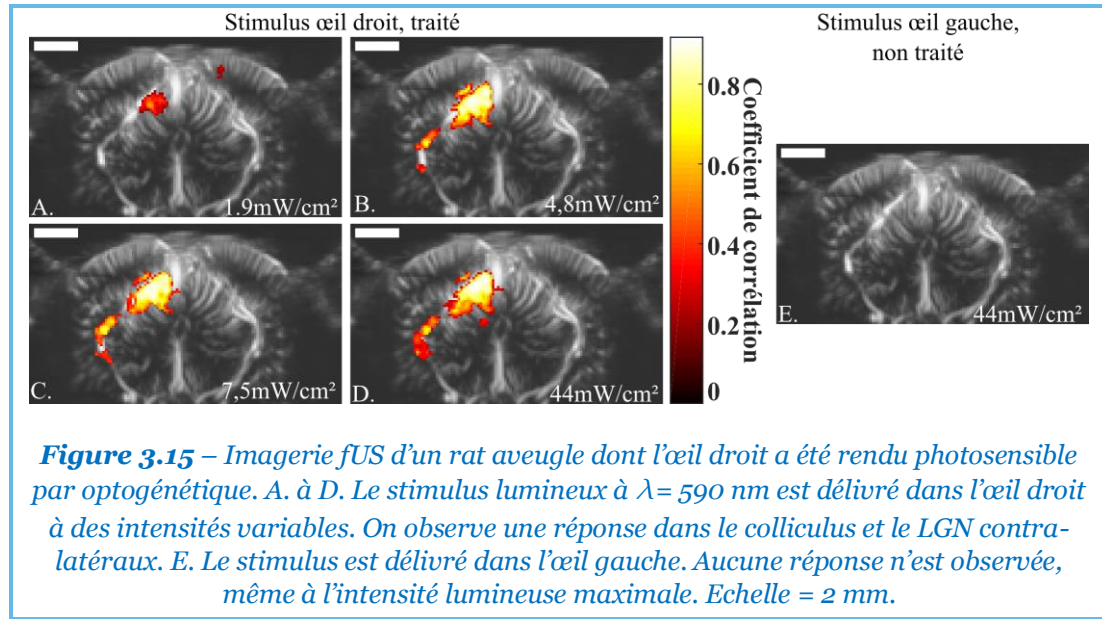
3.2.6.2. Thérapie optogénétique

Pour cette étude, nous étudions 2 rats ayant la mutation P23H (Gorbatyuk et al., 2010), aveugles du fait d'une dégénérescence des cellules photoréceptrices de la rétine. Ces deux animaux ont également reçu une injection intravitréale de ChR2 td Tomato dans l'œil droit sensée faire exprimer une opsine photosensible dans les cellules ganglionnaires et donc restaurer certains sens visuels. Nous souhaitons vérifier par fUS cette assertion.

Pour ce faire nous présentons notre stimulus clignotant à ces rats via une fibre optique éclairant soit leur œil gauche ou droit et à la longueur d'onde lumineuse $\lambda = 590 \text{ nm}$ à laquelle les opsines utilisées sont sensibles. Nous réalisons plusieurs imageries par animal et, à l'aide d'un potentiomètre, faisons varier l'intensité lumineuse délivrée dans l'œil entre $1,9 \text{ mW/cm}^2$ et 44 mW/cm^2 entre chaque séquence fUS.

La **Figure 3.15** résume le résultat de cette étude sur un des deux animaux. On y observe qu'un stimulus dans l'œil traité par optogénétique provoque bien une réponse CBV dans le colliculus supérieur et dans le LGN contra-latéral pour les intensités considérées. En revanche, lorsqu'on stimule l'œil non-traité, on n'observe aucune réponse quelle que soit l'intensité utilisée. Ainsi, on peut conclure qu'en plus de rendre les cellules ganglionnaires photosensibles, le traitement optogénétique engendre bien une activité cérébrale dans des aires visuelles.

Notons également que ces intensités lumineuses sont dans une gamme admissible pour l'œil humain.



Le lecteur notera sans doute, que dans ces deux dernières études, on observe exclusivement des réponses sous-corticales (colliculus et LGN) mais peu ou pas de réponse corticale. Au cours de cette thèse, nous avons fréquemment constaté que, chez le rat, on peut avoir facilement et de façon extrêmement répétable une réponse sous-corticale très propre, alors qu'une réponse corticale est plus rare et demande plus de travail (voir 3.2.2). Il est possible que cela soit dû à l'anesthésie ou au fait que la vision chez les rats soit un sens moins développé que chez les primates, comme on l'a vu en introduction (1.1). Dans le cas des rats P23H, on peut ajouter que ces animaux sont aveugles depuis plusieurs mois. Il est donc possible que la réponse corticale ait été inhibée par plasticité cérébrale. Aussi, ils pourraient avoir retrouvé une rétine photosensible mais leurs cerveaux ne sauraient pas encore comment traiter cette information. Dans la suite du projet, nous envisageons un suivi de ce type d'animaux afin de voir si leurs réponses cérébrales changent, ce qui suggèreraient un apprentissage du sens de la vision. Des expérimentations avec des primates, dont le cortex visuel est plus développé, devraient également permettre de conclure s'il s'agit uniquement d'un problème de sensibilité corticale.

Enfin, ces études viennent compléter d'autres études sur les implants rétinien (Chuang et al., 2014; Lorach et al., 2015) et la thérapie optogénétique (Macé et al., 2015; Sahel et al., 2016; Sengupta et al., 2016). En effet, il a déjà été montré à l'échelle microscopique que ces méthodes restaurent, au moins partiellement, la fonction de la rétine. Des tests de comportement sur rongeurs et primates ont également montré des résultats positifs. Et enfin, les patients portant des implants rétinien retrouvent des sensations visuelles. Toutefois, si les mécanismes de restauration visuelle au niveau de la rétine sont bien compris, ce n'est pas le cas des mécanismes d'interaction entre l'implant et le reste du système visuel. Nous montrons ici que l'imagerie fUS permet d'imager au niveau macroscopique la réactivation du système visuel par optogénétique ou implants rétinien. L'imagerie fUS pourrait ainsi permettre un jour de comprendre

les processus biologiques et cérébraux mis en jeu dans ces techniques de restauration visuelle y compris chez l'animal éveillé.

3.3. Aller plus loin : Explorer la richesse spatiotemporelle du système visuel

On a vu dans ce chapitre de nombreux résultats biologiques obtenus avec une séquence d'imagerie ultrasonore quasiment inchangée. Dans cette partie, nous allons voir de nouveaux développements techniques qui pourraient profiter à l'imagerie des aires visuelles.

3.3.1. Imagerie fUS continue et résolution temporelle

Les données récoltées par la séquence d'imagerie fUS décrite en 3.1.3 sont, en quelque sorte, lacunaires. En effet, après chaque bloc de tirs pour former 200 images durant 0,4 s, nous devons rapatrier ces données vers la mémoire vive puis former ces images par formation de voies et enfin les sauvegarder sur un disque dur. Tout ceci prend du temps, ce qui nous a obligés à ne faire qu'un bloc de 200 images pendant 0,4 s, suivi de 0,6 s de pause toutes les secondes, soit 40% de données utiles. Si on est capable de supprimer cette pause, il devient alors possible d'imager le milieu à une cadence continue de 500 images par secondes sans aucune pause pendant aussi longtemps que nécessaire.

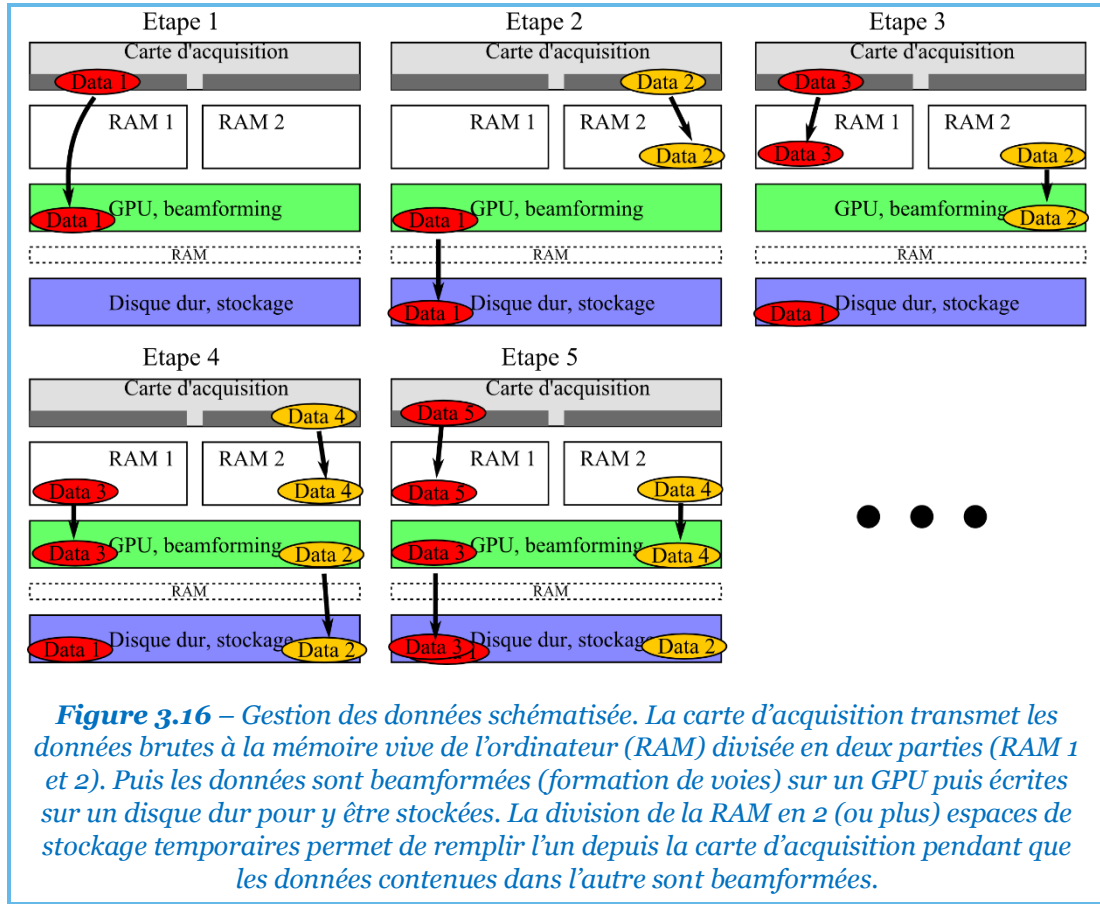
3.3.1.1. Améliorations « software »

Pour atteindre ce but, commençons par décrire la stratégie de traitement et stockage des données que nous utilisons, schématisée sur la **Figure 3.16**. Elle repose sur le fait que les ordinateurs modernes peuvent avoir plusieurs espaces de stockages et sont capables d'effectuer des tâches simultanément grâce aux processeurs multi-cœurs. Ainsi, nous divisons la mémoire vive (RAM) de l'ordinateur en 2 (ou plus) espaces de stockage (appelés « buffers »). Lorsque le bloc de données nécessaire à la formation de 200 images est généré, il est envoyé de la carte d'acquisition vers un de ces buffers puis dans la carte graphique (GPU) pour la formation de voies, puis les images ainsi formées sont enregistrées sur un disque dur après un passage en RAM. Pendant ce temps, le bloc de données nécessaire aux 200 images suivantes est généré et envoyé sur le deuxième buffer, dans lequel, il va attendre que la formation de voies et la sauvegarde du bloc précédent soit finie. Le troisième bloc peut ensuite être envoyé dans le buffer n°1 puisqu'il est vide en attendant que le deuxième bloc soit beamformé. Et ainsi de suite.

De cette façon, il est possible d'enchaîner les blocs d'acquisition sans pause, si le temps nécessaire au transfert d'un bloc de données, à son beamforming et à sa sauvegarde est inférieur au temps d'acquisition ultrasonore de ce bloc de données. On peut ainsi s'affranchir de la pause entre chaque bloc de données et en recollant les séries d'images après coup, il est possible d'avoir un film d'images ultrasonores échantillonnées à une

cadence d'imagerie de l'ordre de 500 images par seconde (N.B. : Au besoin, il est toujours possible de rajouter une pause après l'acquisition.).

Ce faisant, l'opération la plus limitante de ce pipeline est le beamforming. Par la suite, nous l'avons accéléré en adaptant mieux notre code à l'architecture du GPU, en simplifiant la lecture des données par le GPU et finalement en ajoutant la possibilité de ne beamformer que certains pixels de l'image.



Pour gagner encore du temps, nous utilisons un code de sauvegarde sur disque dur asynchrone qui utilise un cœur autonome du processeur de l'ordinateur qui stocke les données à écrire sur une autre portion de la RAM avant de les écrire dans leur destination.

3.3.1.2. Un nouvel échographe de recherche

Toutes les opérations décrites ci-dessus aboutissent à un temps de calcul réduit, mais finalement encore trop grand avec l'échographe que nous utilisons jusqu'à présent. Pour aller plus loin, nous changeons de carte d'acquisition et choisissons d'utiliser un échographe de recherche *Vantage* de *Verasonics* (Kirkland, USA). Une des caractéristiques intéressantes de cette machine est que l'ordinateur pilotant la baie d'acquisition peut être intégralement changé. Ainsi, en utilisant un ordinateur puissant équipé du dernier modèle de carte graphique (*GTX GeForce 1080*, NVIDIA, Santa

Clara, USA), notre algorithme de formation de voies atteint les vitesses de calcul espérées et nous pouvons désormais imager les tissus en imageries ondes planes avec des cadences entre 500 et 1000 images ultrasonores par seconde sans pause pendant plusieurs minutes.

3.3.1.3. Extraire de nouvelles informations

Grâce à ce nouveau type d'imagerie, nous pouvons envisager de tirer bien plus d'informations des images ainsi obtenues.

Jusqu'à présent, nous étions limités à une image CBV par seconde car nous moyennions un bloc de 200 images ultrasonores filtrées pour s'affranchir des battements du cœur. Mais il est maintenant possible d'imager les flux sanguins à la cadence de 1000 images par seconde. Ceci nous donne la possibilité de penser différemment notre imagerie et d'accéder à de nouvelles informations jusqu'alors inaccessibles :

- Imagerie fonctionnelle haute cadence. Pour peu qu'on soit capable de s'affranchir de l'influence des battements cardiaques et de la respiration sur les flux sanguins par filtrage, il devient possible de suivre la réponse CBV à un stimulus à 1000 images par seconde. Cela permettra des caractérisations temporelles plus précises des réponses CBV. Par exemple dans le cas de la mesure de délais entre les différentes aires visuelles ou entre les capillaires et les plus gros vaisseaux.
- Signal cardiaque. Plutôt que d'enlever son influence dans le signal, on peut l'étudier. Une application possible est une simple mesure de l'évolution du rythme cardiaque au cours de l'expérience pour suivre l'anesthésie. Mais on peut imaginer qu'un tel signal contient plus d'informations et qu'on pourrait en tirer bien plus.

3.3.2. Augmenter la résolution spatiale

Toutes les imageries de ce chapitre sont réalisées à 15 MHz. Mais nous avons vu en 2.2.1 qu'on peut imager les tissus à 30 MHz pour augmenter la résolution. Les pixels ainsi obtenus sont deux fois plus petits que précédemment. De plus les séquences utilisées sur l'œil étant les mêmes que celles utilisées sur le cerveau, il est possible de faire de l'imagerie fUS du cerveau à 30 MHz. Ceci permettrait d'observer des structures plus fines dans le cortex du rat comme l'organisation en colonnes du *barrel cortex* du rat, ou encore de faire des tomographies vasculaires ou des rétinotopies encore plus précises.

3.3.3. Vers une imagerie 3D plus complète

L'imagerie fUS en trois dimensions décrite en 3.2.3.1 est prometteuse, mais reste perfectible. En effet, il s'agit simplement d'une concaténation de plusieurs plans d'imagerie indépendants entre eux. Et le protocole reste long et fastidieux.

3.3.3.1. *Des moteurs rapides pour des plans interdépendants*

Nous avons expliqué en 3.3.1 comment accélérer la formation de voies. Plutôt que de générer plus de données dans un plan on peut tirer parti autrement de cette augmentation. En effet, si on dispose de moteurs suffisamment rapides et qu'on observe un phénomène qui varie raisonnablement lentement, il est possible de bouger la sonde entre chaque bloc de 200 images, soit toutes les 0,4 s. Ainsi, on peut, par exemple, imager jusqu'à 5 plans en 2 s. Moyennant un déphasage entre chacun de ces plans, ils sont alors interdépendants et l'imagerie fUS 3D réalisée est plus complète et 5 fois plus rapide.

3.3.3.2. *Réseau de transducteurs 2D, Sondes RCA*

Finalement, le plus complet pour réaliser une imagerie en trois dimensions, est d'imager directement des volumes avec des sondes 2D avec des matrices de $32 \times 32 = 1024$ éléments piézoélectriques. L'échographe utilisé est alors bien plus complexe et la quantité de données générées plus importante mais ceci permettrait d'acquérir le volume fonctionnel bien plus rapidement. De plus, il a déjà été démontré que cette technique pouvait réaliser une imagerie vasculaire des gros vaisseaux (Correia et al., 2016; Provost et al., 2014), rien ne s'oppose donc, en théorie, à ce que ces sondes puissent être utilisées en imagerie fonctionnelle par ultrasons.

Toutefois, les matrices 2D de ce type s'accompagnent d'un appareillage très lourd (1024 voies d'émissions et quatre échographes synchronisés pour piloter le tout). D'autres sondes 2D sont en cours de développement qui devraient permettre d'acquérir des volumes de tailles comparables voire plus grands mais qui puissent être pilotées par un échographe classique de 128 ou 256 voies. Parmi ces sondes, citons les sondes matricielles de type *Row-Column Addressed* (RCA) (Flesch et al., 2017) qui permettent cette simplification tout en offrant une qualité d'imagerie intéressante.

3.3.4. Mieux prendre en compte la complexité biologique

Les résultats biologiques que nous avons montrés dans ce chapitre, relèvent plus de la preuve de concept. Ayant montré que notre technique fonctionne bien, nous allons pouvoir orienter les expériences *in-vivo* vers de nouvelles études plus avancées du système visuel.

3.3.4.1. *Rat éveillé, expérimentation chronique*

Jusqu'à présent, nos expériences animales étaient réalisées en aigüe et les rats devaient être sacrifiés à la fin de la session d'imagerie. Dans la suite du projet, nous souhaitons pouvoir réutiliser les animaux. Pour ce faire, comme expliqué en 3.2.6.1, nous remplaçons le crâne par une prothèse en polymère transparent aux ultrasons (TPX) (Sieu et al., 2015). Cette prothèse nous permet non seulement de réduire drastiquement le nombre d'animaux sacrifiés, mais elle autorise aussi des études longitudinales de suivi des animaux et d'évolution de leur réponse fonctionnelle.

Nous souhaitons également nous affranchir de l'anesthésie. En effet, il a été montré de nombreuses fois que l'anesthésie a un fort impact sur le couplage neurovasculaire et sur la réponse fonctionnelle (Gao et al., 2016). Nous concevons actuellement un dispositif dans lequel un animal entraîné pourra être imagé éveillé avec la tête fixée mais avec la possibilité de se déplacer sur une boule.

3.3.4.2. *Variation du paradigme de stimulation*

Une fois que nous serons capables d'imager des rats éveillés avec la tête fixée, nous changerons de paradigme de stimulation afin de continuer à explorer le système visuel. Dans un premier temps, ceci permettra d'observer les différences entre les états d'anesthésie et d'éveil.

Nous pourrions également explorer d'autres paramètres comme la fréquence spatiale des stimuli utilisés. En effet, jusqu'à maintenant nous utilisons un écran uniforme mais il est possible qu'un certain niveau de détail dans le stimulus stimule plus fortement le système visuel comme par exemple avec des « gratings » plus ou moins rapprochés ou des échiquiers clignotants dont on fera varier la taille des cases au cours des différentes sessions d'imagerie, comme on faisait varier le contraste et la fréquence temporelle en 3.2.2. Tout ceci pourrait être couplé à une lampe à fente (voir 3.2.6.1) pour stimuler plus précisément la rétine et réaliser des rétino-topies encore plus précises.

Enfin, ce type de dispositif pourrait nous permettre de suivre la réponse de rats ayant reçu des implants rétinien ou une thérapie optogénétique et peut-être d'observer une évolution de leur réponse fonctionnelle avec le temps.

3.4. Conclusion du chapitre

Ainsi s'achève ce chapitre sur l'imagerie fonctionnelle des aires de la vision du rat, où nous avons vu comment l'imagerie fUS pouvait nous permettre d'explorer le traitement primaire de l'information visuelle dans le cerveau de cet animal.

En reprenant dans un premier temps, des séquences d'imagerie fUS ayant fait leurs preuves, nous avons conçu un dispositif permettant de stimuler proprement le champ visuel de rats anesthésiés. Avec un stimulus simple consistant en un écran clignotant, nous avons mis en évidence trois aires distinctes traitant l'information visuelle : Le cortex visuel (V1/V2), le Colliculus Supérieur (SC) et les Corps Géniculés Latéraux (LGN).

En couplant notre séquence à une série de translations de la sonde échographique nous avons pu imaginer ces zones en trois dimensions et en profondeur dans le cerveau avec une bonne résolution et ainsi réaliser la première imagerie fUS en trois dimensions.

Plus tard, uniquement par de simples variations de notre stimulus dans ces trois zones nous avons pu vérifier quelques phénomènes déjà mis en évidence par d'autres techniques : ces zones sont sensibles à des variations de la fréquence et du contraste de clignotement de l'écran et il existe un optimal que nous avons trouvé. Les réponses

vasculaires de ces zones n'arrivent pas au même instant. Ainsi, nous avons montré que le cortex visuel répondait 0,4 s plus tard que le colliculus supérieur. Nous avons ensuite montré qu'il était possible de séparer les contributions spectrales des divers types de vaisseaux participant à l'architecture micro-vasculaire cérébrale dans le signal CBV et que de façon analogue, la réponse CBV fonctionnelle semble arriver plus tôt dans les capillaires que dans les artérioles et veinules. Et finalement nous avons redémontré l'organisation rétinotopique du traitement visuel dans ces zones et avons montré deux façons de construire ces cartes. Au-delà de la simple preuve de concept, certaines de ces mesures pourraient se révéler intéressantes lors d'études cliniques ou précliniques. En effet, les retards d'arrivée de la réponse CBV semblent, par exemple, constituer un biomarqueur intéressant pour l'étude de certaines pathologies cérébrales liées au couplage neurovasculaire.

En nous servant toujours de notre stimulus simple nous avons démontré l'efficacité de deux thérapies de restauration visuelle : des implants rétiniens et des injections optogénétiques. L'imagerie fUS pourrait ainsi être une méthode prometteuse pour la compréhension du processus d'intégration par l'organisme de ces thérapies et pourrait même fournir une observation inédite de la plasticité cérébrale mise en jeu lors cet apprentissage.

Enfin, nous avons montré les derniers développements technologiques que nous avons mis au point au cours de ce projet et qui permettront par la suite d'enrichir l'imagerie fUS de nouvelles informations encore plus précises. Nous espérons pouvoir bientôt appliquer ces améliorations à notre nouveau dispositif d'imagerie chronique d'animaux éveillés.

3.5. Bibliographie

- Albrecht, D.G., Hamilton, D.B., 1982. Striate cortex of monkey and cat: contrast response function. *J. Neurophysiol.* 48, 217–237.
- Bailey, C.J., Sanganahalli, B.G., Herman, P., Blumenfeld, H., Gjedde, A., Hyder, F., 2013. Analysis of Time and Space Invariance of BOLD Responses in the Rat Visual System. *Cereb Cortex* 23, 210–22. doi:10.1093/cercor/bhs008
- Bakker, R., Tiesinga, P., Kötter, R., 2015. The Scalable Brain Atlas: Instant Web-Based Access to Public Brain Atlases and Related Content. *Neuroinformatics* 353–366. doi:10.1007/s12021-014-9258-x
- Carter, G.C., 1987. Coherence and time delay estimation. *Proc. IEEE* 75, 236–255. doi:10.1109/PROC.1987.13723
- Chuang, A.T., Margo, C.E., Greenberg, P.B., 2014. Retinal implants: a systematic review. *Br. J. Ophthalmol.* 98, 852–856. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-303708
- Correia, M., Provost, J., Tanter, M., Pernot, M., 2016. 4D ultrafast ultrasound flow imaging: *in vivo* quantification of arterial volumetric flow rate in a single heartbeat. *Phys. Med. Biol.* 61, L48–L61. doi:10.1088/0031-9155/61/23/L48
- De Jong, P.G.M., Arts, T., Hoeks, A.P.G., Reneman, R.S., 1990. Determination of tissue motion velocity by correlation interpolation of pulsed ultrasonic echo signals. *Ultrason. Imaging* 12, 84–98. doi:10.1016/0161-7346(90)90152-N

- Demené, C., Tiran, E., Sieu, L.A., Bergel, A., Gennisson, J.L., Pernot, M., Deffieux, T., Cohen, I., Tanter, M., 2015. 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. *Neuroimage* 127, 472–483. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.11.014
- Flesch, M., Pernot, M., Provost, J., Ferin, G., Nguyen-Dinh, A., Tanter, M., Deffieux, T., 2017. 4D in-vivo ultrafast ultrasound imaging using a row-column addressed matrix and coherently-compounded orthogonal plane waves. *Phys. Med. Biol.* doi:10.1088/1361-6560/aa63d9
- Fukuda, Y., Iwama, K., 1978. Visual Receptive-field Properties of Single Cells in the Rat Superior Colliculus. *Jpn. J. Physiol.* 28, 385–400. doi:http://doi.org/10.2170/jjphysiol.28.385
- Gao, Y.R., Ma, Y., Zhang, Q., Winder, A.T., Liang, Z., Antinori, L., Drew, P.J., Zhang, N., 2016. Time to wake up: Studying neurovascular coupling and brain-wide circuit function in the un-anesthetized animal. *Neuroimage* 153, 382–398. doi:10.1016/j.neuroimage.2016.11.069
- Gias, C., Hewson-Stoate, N., Jones, M., Johnston, D., Mayhew, J.E., Coffey, P.J., 2005. Retinotopy within rat primary visual cortex using optical imaging. *Neuroimage* 24, 200–206. doi:10.1016/j.neuroimage.2004.08.015
- Gorbatyuk, M.S., Knox, T., LaVail, M.M., Gorbatyuk, O.S., Noorwez, S.M., Hauswirth, W.W., Lin, J.H., Muzyczka, N., Lewin, A.S., 2010. Restoration of visual function in P23H rhodopsin transgenic rats by gene delivery of BiP/Grp78. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 5961–5966. doi:10.1073/pnas.0911991107
- Gould, I., Tsai, P.S., Kleinfeld, D., Linninger, A., 2016. The capillary bed offers the largest hemodynamic resistance to the cortical blood supply. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* doi:10.1177/0271678X16671146
- Hillman, E.M.C., Devor, A., Bouchard, M.B., Dunn, A.K., Krauss, G.W., Skoch, J., Bacskai, B.J., Dale, A.M., Boas, D.A., 2007. Depth-resolved optical imaging and microscopy of vascular compartment dynamics during somatosensory stimulation. *Neuroimage* 35, 89–104. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.11.032
- Hudetz, A.G., 1997. Blood Flow in the Cerebral Capillary Network: A Review Emphasizing Observations with Intravital Microscopy. *Microcirculation* 4, 233–252. doi:10.3109/10739689709146787
- Kalatsky, V. a., Stryker, M.P., 2003. New paradigm for optical imaging: Temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron* 38, 529–545. doi:10.1016/S0896-6273(03)00286-1
- Kjonigsen, L.J., Lillehaug, S., Bjaalie, J.G., Witter, M.P., Leergaard, T.B., 2015. Waxholm Space atlas of the rat brain hippocampal region: Three-dimensional delineations based on magnetic resonance and diffusion tensor imaging. *Neuroimage* 108, 441–449. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.12.080
- Li, B., Freeman, R.D., 2007. High-Resolution Neurometabolic Coupling in the Lateral Geniculate Nucleus. *J. Neurosci.* 27, 10223–10229. doi:10.1523/JNEUROSCI.1505-07.2007
- Lorach, H., Goetz, G., Mandel, Y., Lei, X., Kamins, T.I., Mathieson, K., Huie, P., Dalal, R., Harris, J.S., Palanker, D., 2015. Performance of photovoltaic arrays in-vivo and characteristics of prosthetic vision in animals with retinal degeneration. *Vision Res.* 111, 142–148. doi:10.1016/j.visres.2014.09.007
- Lund, R.D., Girman, S. V, Sauve, Y., Sergej, V., Receptive, R.D.L., Sauv e, Y., 1999. Receptive field properties of single neurons in rat primary visual cortex. *J. Neurophysiol.* 82, 301–11.

- Macé, E., Caplette, R., Marre, O., Sengupta, A., Chaffiol, A., Barbe, P., Desrosiers, M., Bamberg, E., Sahel, J.-A., Picaud, S., Duebel, J., Dalkara, D., 2015. Targeting Channelrhodopsin-2 to ON-bipolar Cells With Vitreally Administered AAV Restores ON and OFF Visual Responses in Blind Mice. *Mol. Ther.* 23, 7–16. doi:10.1038/mt.2014.154
- Ngai, a C., Jolley, M. a, D'Ambrosio, R., Meno, J.R., Winn, H.R., 1999. Frequency-dependent changes in cerebral blood flow and evoked potentials during somatosensory stimulation in the rat. *Brain Res.* 837, 221–228. doi:S0006-8993(99)01649-2 [pii]
- Papp, E.A., Leergaard, T.B., Calabrese, E., Johnson, G.A., Bjaalie, J.G., 2014. Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain. *Neuroimage* 97, 374–386. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.04.001
- Pawela, C.P., Biswal, B.B., Hudetz, A.G., Schulte, M.L., Li, R., Jones, S.R., Cho, Y.R., Matloub, H.S., Hyde, J.S., 2009. A protocol for use of medetomidine anesthesia in rats for extended studies using task-induced BOLD contrast and resting-state functional connectivity. *Neuroimage* 46, 1137–1147. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.03.004
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed.
- Provost, J., Papadacci, C., Arango, J.E., Imbault, M., Fink, M., Gennisson, J.-L., Tanter, M., Pernot, M., 2014. 3D ultrafast ultrasound imaging in vivo. *Phys. Med. Biol.* 59, L1–L13. doi:10.1088/0031-9155/59/19/L1
- Renema, W.K.J., Kan, H.E., Wieringa, B., Heerschap, A., 2007. In vivo magnetic resonance spectroscopy of transgenic mouse models with altered high-energy phosphoryl transfer metabolism. *NMR Biomed.* 20, 448–467. doi:10.1002/nbm
- Rosazza, C., Minati, L., 2011. Resting-state brain networks: Literature review and clinical applications. *Neurol. Sci.* 32, 773–785. doi:10.1007/s10072-011-0636-y
- Sahel, J., Dalkara, D., Duebel, J., Benosman, R., Chenegros, G., Douar, A.M., Chavas, J., Bouquet, C., Pruneau, D., Roska, B., Picaud, S., 2016. Optogenetic engineering of retinal ganglion cells with AAV2.7m8-ChrimsonR-tdTomato (GS030) in combination with an event-based camera photostimulation device. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57.
- Sandrin, L., Catheline, S., Tanter, M., Hennequin, X., Fink, M., 1999. Time-Resolved Pulsed Elastography with Ultrafast Ultrasonic Imaging. *Ultrason. Imaging* 21, 259–272. doi:10.1177/016173469902100402
- Saul, A.B., Feidler, J.C., 2002. Development of Response Timing and Direction Selectivity in Cat Visual Thalamus and Cortex. *J. Neurosci.* 22, 2945–2955.
- Schuett, S., Bonhoeffer, T., Hübener, M., 2002. Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *J. Neurosci.* 22, 6549–6559. doi:20026635
- Sengupta, A., Chaffiol, A., Macé, E., Caplette, R., Desrosiers, M., Lampič, M., Forster, V., Marre, O., Lin, J.Y., Sahel, J., Picaud, S., Dalkara, D., Duebel, J., 2016. Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina. *EMBO Mol. Med.* 8, 1248–1264. doi:10.15252/emmm.201505699
- Sergejeva, M., Papp, E.A., Bakker, R., Gaudnek, M.A., Okamura-Oho, Y., Bolin, J., Bjaalie, J.G., Hess, A., 2015. Anatomical landmarks for registration of experimental image data to volumetric rodent brain atlasing templates. *J. Neurosci. Methods* 240, 161–169. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.11.005
- Shih, A.Y., Driscoll, J.D., Drew, P.J., Nishimura, N., Schaffer, C.B., Kleinfeld, D., 2012. Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1277–1309. doi:10.1038/jcbfm.2011.196
- Shih, A.Y., Friedman, B., Drew, P.J., Tsai, P.S., Lyden, P.D., Kleinfeld, D., 2009. Active dilation

- of penetrating arterioles restores red blood cell flux to penumbral neocortex after focal stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 738–751. doi:10.1038/jcbfm.2008.166
- Siegel, J.S., Snyder, A.Z., Ramsey, L., Shulman, G.L., Corbetta, M., 2016. The effects of hemodynamic lag on functional connectivity and behavior after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 2162–2176. doi:10.1177/0271678X15614846
- Sieu, L.-A., Bergel, A., Tiran, E., Deffieux, T., Pernot, M., Gennisson, J.-L., Tanter, M., Cohen, I., 2015. EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats. *Nat Methods* 12, 831–834. doi:10.1038/nmeth.3506
- Van Camp, N., Verhoye, M., De Zeeuw, C.I., Van der Linden, A., 2006. Light Stimulus Frequency Dependence of Activity in the Rat Visual System as Studied With High-Resolution BOLD fMRI. *J. Neurophysiol.* 95, 3164–3170. doi:10.1152/jn.00400.2005.
- Vanni, M.P., Provost, J., Lesage, F., Casanova, C., 2010. Evaluation of receptive field size from higher harmonics in visuotopic mapping using continuous stimulation optical imaging. *J. Neurosci. Methods* 189, 138–150. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.03.013
- Walker, W.F., Trahey, G.E., 1994. A fundamental limit on the accuracy of speckle signal alignment. *IEEE Ultrason. Symp.* 1787–1792. doi:10.1109/ULTSYM.1994.401937
- Wang, L., Sarnaik, R., Rangarajan, K., Liu, X., Cang, J., 2010. Visual receptive field properties of neurons in the superficial superior colliculus of the mouse. *J. Neurosci.* 30, 16573–84. doi:10.1523/JNEUROSCI.3305-10.2010
- Warnking, J., Dojat, M., Guérin-Dugué, a, Delon-Martin, C., Olympieff, S., Richard, N., Chéhikian, a, Segebarth, C., 2002. fMRI retinotopic mapping--step by step. *Neuroimage* 17, 1665–1683. doi:10.1006/ning.2002.1304
- Wibral, M., Muckli, L., Melnikovic, K., Scheller, B., Alink, A., Singer, W., Munk, M.H., 2007. Time-dependent effects of hyperoxia on the BOLD fMRI signal in primate visual cortex and LGN. *Neuroimage* 35, 1044–1063. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.12.039
- Yen, C.C.C., Fukuda, M., Kim, S.G., 2011. BOLD responses to different temporal frequency stimuli in the lateral geniculate nucleus and visual cortex: Insights into the neural basis of fMRI. *Neuroimage* 58, 82–90. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.06.022

4. Imagerie fUS de structures impliquées dans des traitements de l'information visuelle haut niveau chez le primate

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié les aires cérébrales qui traitent la réception de l'information visuelle. Mais dans le cerveau, le transfert d'information ne s'arrête pas à proprement parler à l'entrée sensorielle au sein du cortex visuel primaire. Cette information peut ensuite, en quelques synapses se trouver au cœur de régions corticales ou sous-corticales impliquées notamment dans la programmation d'une action motrice, la prise de décision, la mise en mémoire, etc. Dans ce chapitre, nous allons appliquer l'imagerie fUS à l'étude de la fonction cérébrale de primates non-humains éveillés, exécutant une tâche comportementale oculomotrice, nécessitant des prises de décisions, pour lesquelles ils ont été entraînés.

4.1. Expérimentation animale et primates non-humains

Dans ce chapitre, nous parlerons d'expérimentation sur des primates non-humains (Macaques Rhésus, *Macaca mulatta*). Dans la suite du projet, l'étude sur petit animal n'est plus suffisante. En effet, les rats sont des animaux dont la vision est pauvre, et dont l'organisation du cerveau n'est pas aussi complexe que chez les primates. Par ailleurs, les thérapies de restauration visuelle que nous évoquons régulièrement doivent être testées sur le primate avant l'homme. En effet, il faut un modèle animal assez proche à la fois pour l'anatomie de ses yeux mais aussi pour celle de son cerveau.

Enfin, ce modèle est nécessaire pour un des tests d'efficacité des thérapies : le protocole de tâches de saccades et d'anti-saccades dont nous parlerons en 4.3. En effet, la bonne exécution de ces tâches oculomotrices est essentielle pour valider et explorer l'efficacité des restaurations visuelles dans toutes leurs complexités.

4.2. Imagerie fUS du primate anesthésié

L'imagerie du primate éveillé comporte quelques contraintes fortes. L'animal doit être entraîné à exécuter des tâches visuelles qui peuvent être complexes et nécessitent parfois jusqu'à un an complet d'entraînement. Aussi, et avant d'aller vers l'imagerie de l'animal éveillé, en protocole complexe, nous avons voulu reproduire les résultats obtenus sur le cortex visuel du rat. Le primate est en effet l'étape suivante pour le test des techniques de restauration visuelle et il sera nécessaire de les valider également sur ce modèle.

4.2.1. Matériel et méthode

Certaines parties du protocole expérimental sont similaires au protocole utilisé avec les rats. Pour plus de détails, le lecteur peut se référer au 3.1, page 56.

4.2.1.1. Modèle animal

Afin de tester la faisabilité de nos premiers protocoles, nous avons pu bénéficier d'un don d'organes et du sacrifice de deux animaux en fin de protocoles (protocoles d'expérimentation pharmacologiques). Dans ce cadre nous avons mis à profit la programmation de leurs anesthésies terminales pour imager leurs fonctions visuelles, ce afin de mieux préparer les expériences suivantes et ainsi réduire le nombre total d'animaux.

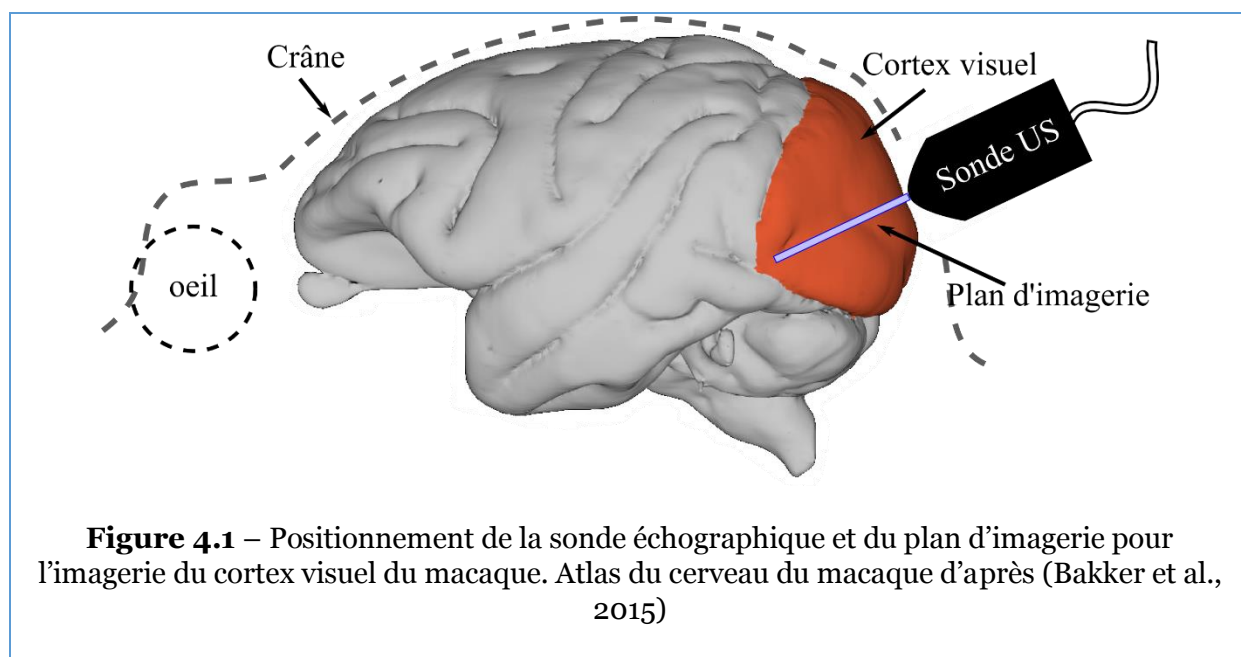
Pour cette intervention chirurgicale, le singe est tranquilisé dans sa cage par injection intramusculaire de kétamine 1000 (3 mg/kg) et de dexmédétomidine (Dexdomitor 0,015 mg/kg). Une canule intratrachéale est mise en place après une anesthésie locale de la trachée (spray de xylocaïne). L'animal est ensuite profondément anesthésié par inhalation d'oxygène (1 L), et d'isoflurane (1,5 - 2%). Il reçoit un analgésique puissant, butorphanol (Dolorex 0,2 mg/kg) (utilisé uniquement sous respiration assistée). Un

Imagerie fUS de structures impliquées dans des traitements de l'information visuelle haut niveau chez le primate

cathéter intraveineux est installé pour l'administration de fluides physiologiques (10 ml/kg/hr). L'animal est monitoré (saturation, rythme cardiaque et température).

La chirurgie commence par une incision du scalp pour dégager le crâne puis une fenêtre rectangulaire est fraisée dans l'os pariétal afin d'exposer le cortex visuel. On positionne la sonde au-dessus d'un des deux cortex, à proximité du sinus veineux, de manière à imagier dans une coupe coronale (**Figure 4.1**).

Tout au long de l'expérience, l'animal est maintenu dans l'obscurité afin d'augmenter sa sensibilité aux stimuli visuels. Pendant la chirurgie, ses yeux sont dissimulés sous un tissu puis, lors de l'imagerie, toutes les lumières sont éteintes, à l'exception des stimuli visuels.



4.2.1.2. Stimulation visuelle

Les stimuli visuels sont présentés à l'aide de notre écran de stimulation (voir 3.1.2), placé à 20 cm en face des yeux de l'animal. Et nous utilisons le même paradigme de stimulation que sur le rat : 30 s de repos avec un écran totalement noir, puis 30 s de clignotement noir/blanc de l'écran à 3 Hz, le tout suivi de 30 s de repos et ainsi de suite pendant 330 s.

Le dispositif expérimental est ainsi très similaire à celui présenté précédemment pour l'imagerie du rat (voir **Figure 3.1**). A la différence que la sonde échographique n'est pas tenue par des moteurs mais par une simple pince.

4.2.1.3. Séquence fUS

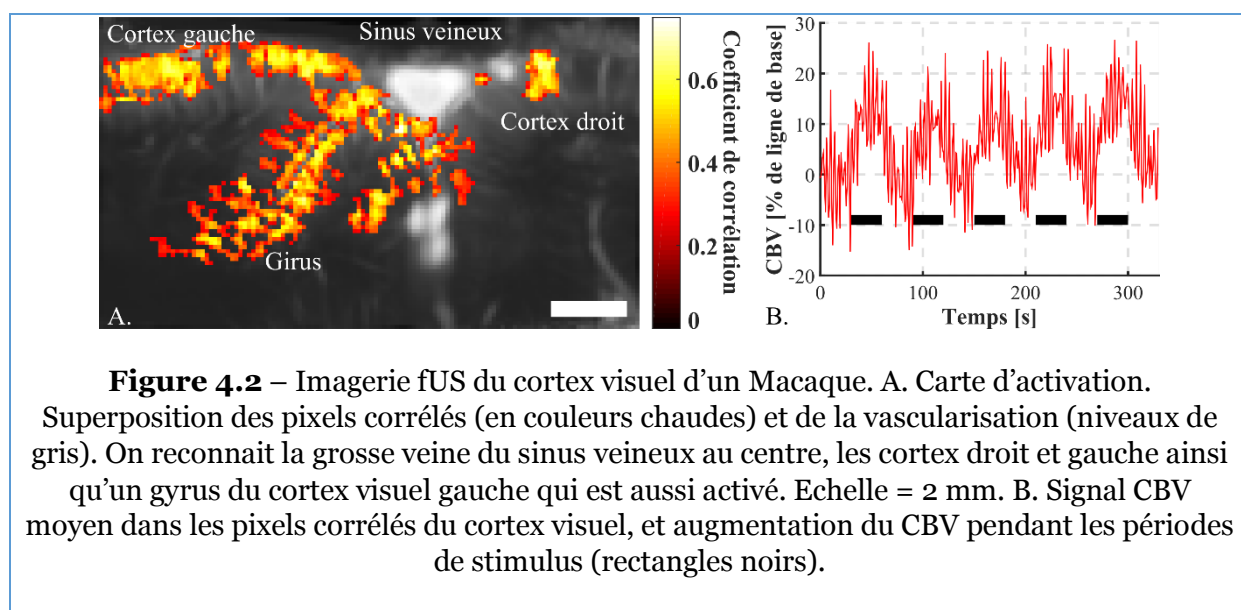
Dans un premier temps, nous utilisons la même sonde 15 MHz que précédemment (128 éléments, pas 110 μm , focale en élévation 8 mm, Vermon ; Tours, France), pilotée par le même échographe ultrarapide (Aixplorer, Supersonic Imagine ; Aix-en-Provence, France), et placée sur le cortex visuel. Le rythme cardiaque des macaques étant plus

lent que celui des rats nous avons procédé à quelques ajustements dans la séquence afin de pouvoir imager en continu (voir 3.3.1) pendant 330 s. Ainsi, nous produisons une image CBV par seconde. Chaque image CBV est la somme incohérente de 500 images ultrasonores acquises en 1 s à 500 images par seconde. Chaque image est la somme cohérente de 8 images en ondes planes acquises à la vitesse (PRF) de 25 kHz dont les angles d'émission sont équi-répartis dans $[-10^\circ ; 10^\circ]$.

De même que précédemment, le film CBV de 330 images est corrélé avec le profil de stimulus pour obtenir une carte de corrélation. Puis on affiche seulement les pixels dont la valeur est supérieure à 3 fois le bruit de corrélation, pour ne garder que les activations significatives.

4.2.2. Résultats

La **Figure 4.2** présente le résultat de cette première imagerie simple. On observe une zone activée qui correspond bien au cortex visuel gauche du primate, ainsi qu'un gyrus de ce cortex descendant plus en profondeur dans le cerveau. Dans ces zones, les augmentations du signal CBV suivent bien le motif de stimulation.



4.2.3. Imager en profondeur

Du fait qu'on ait gardé la même sonde 15 MHz que pour les images du rat, seule une petite partie du cerveau de l'animal peut être imagée. L'image présentée au paragraphe précédent ne montre qu'une partie du cortex visuel et n'est pas assez profonde pour atteindre d'autres zones comme le colliculus supérieur ou les corps géniculés latéraux. En effet, avec une sonde de ce type il devient difficile d'imager les tissus au-delà de 15 mm de profondeur environ.

Ceci est principalement dû à l'absorption des ultrasons par les tissus, qui est d'autant plus forte que la fréquence d'émission est élevée. Ainsi, on rencontre une fois encore le

Imagerie fUS de structures impliquées dans des traitements de l'information visuelle haut niveau chez le primate

compromis classique en imagerie ultrasonore où, plus on souhaite imager en profondeur, plus il faut utiliser une fréquence basse mais plus la résolution obtenue sera faible.

Nous disposons au laboratoire, de plusieurs sondes échographiques, centrées sur différentes fréquences. Nous réalisons ainsi plusieurs imageries avec quatre de ces sondes, afin de voir les champs de vu accessibles avec celles-ci. Ces quatre sondes sont :

- Une sonde centrée à 15 MHz, utilisée préalablement
- Une sonde SuperLinear™ SLH20-6 (Supersonic Imagine ; Aix-en-Provence, France), centrée à 12 MHz, pas de 125 μm
- Une sonde SuperLinear™ SL15-5 (Supersonic Imagine ; Aix-en-Provence, France), centrée à 9 MHz, pas de 200 μm
- Une sonde SuperLinear™ SL10-2 (Supersonic Imagine ; Aix-en-Provence, France), centrée à 6 MHz, pas de 200 μm

Chacune de ces sondes est placée à la surface du cerveau. Nous réalisons une imagerie en Doppler de Puissance et tâchons de voir jusqu'à quelle profondeur cette sonde peut imager le cerveau. Ces sondes n'ont pas le même nombre d'éléments piézoélectriques. Nous réalisons donc nos imageries avec les 128 éléments centraux de chaque sonde. De plus, plus une sonde échographique est basse fréquence, plus l'amplitude maximale des impulsions acoustiques qu'elle peut émettre est grande. Ce qui augmente encore la profondeur maximale d'imagerie en descendant la fréquence. Nous utilisons donc ces sondes à leurs amplitudes d'émissions acoustiques usuelles recommandées par le constructeur.

Quatre images extraites de ces imageries sont présentées sur la **Figure 4.3**. On y voit que la sonde à 15 MHz permet d'observer très finement la vascularisation du cortex. En revanche, sa profondeur de pénétration est insuffisante pour atteindre ne serait-ce que le colliculus supérieur. Comme attendu, on peut imager de plus en profond à mesure qu'on utilise des sondes de plus en plus basse fréquence. Avec la sonde SL10-2, on peut imager toute la profondeur du cerveau et ainsi atteindre facilement le colliculus supérieur et les LGN.

Ainsi, en fonction des aires visuelles à imager et de la résolution souhaitée, on préférera utiliser la sonde 15 MHz ou une sonde SL10-2. La première nous permettra d'imager précisément le cortex, par exemple pour réaliser des rétino-topies corticales. Quant à la seconde, on l'utilisera pour imager la totalité du système visuel du macaque, par exemple pour les tests des implants rétiniens.

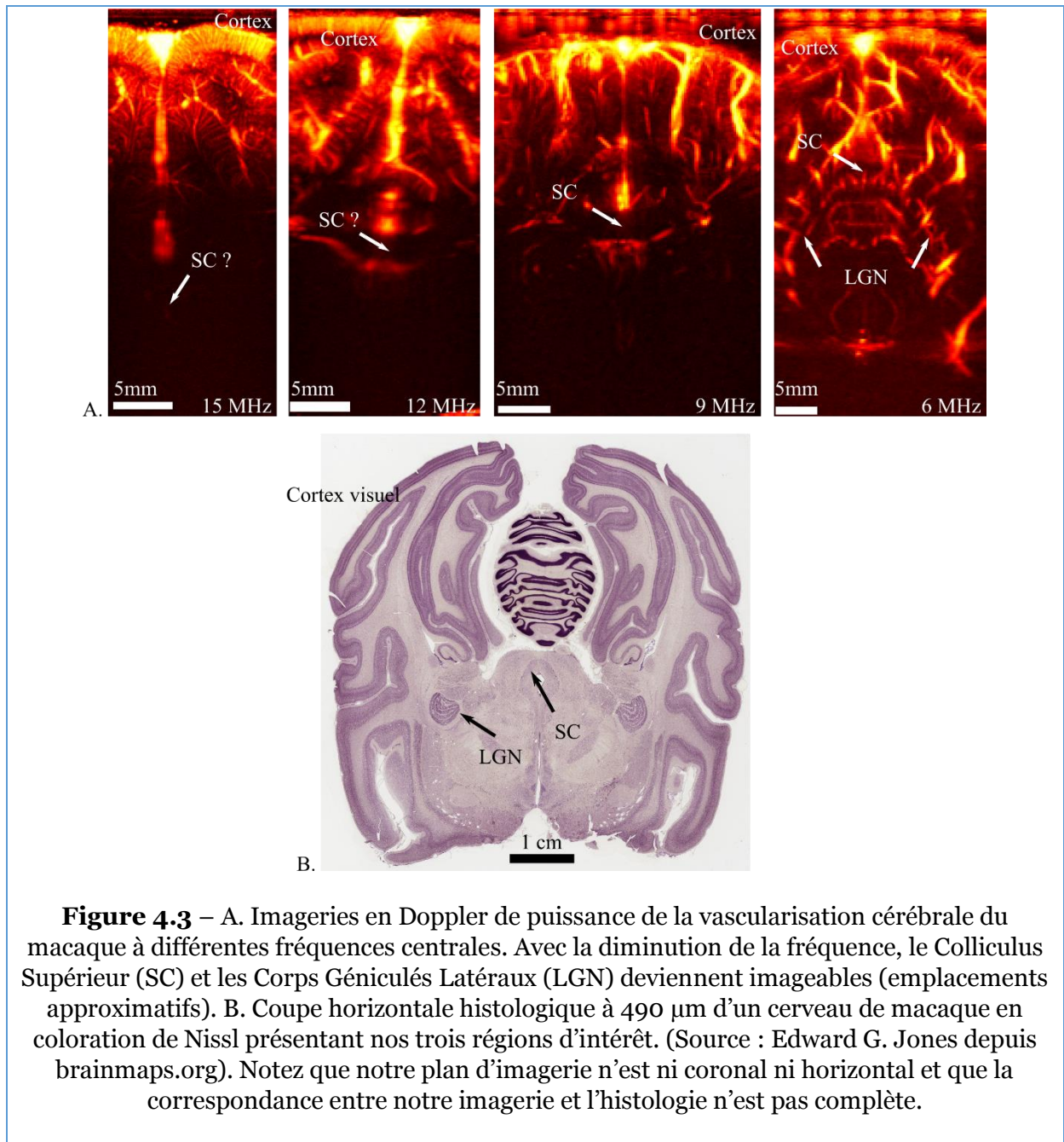


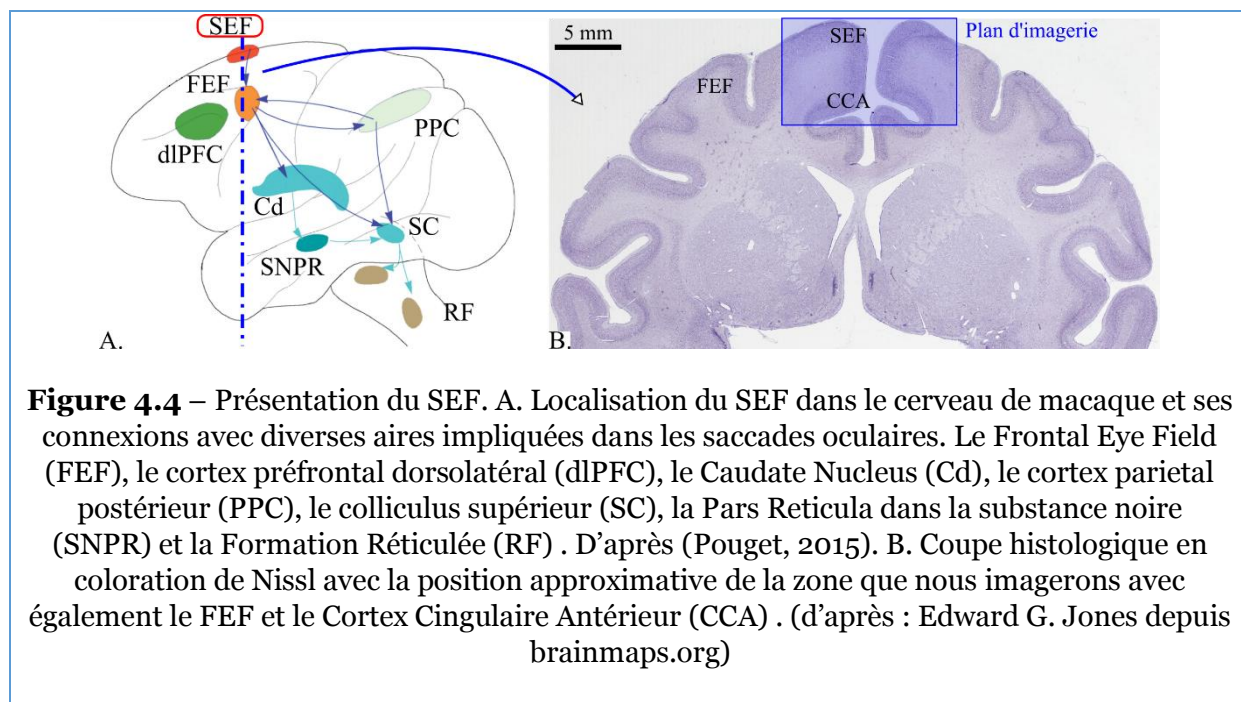
Figure 4.3 – A. Imageries en Doppler de puissance de la vascularisation cérébrale du macaque à différentes fréquences centrales. Avec la diminution de la fréquence, le Colliculus Supérieur (SC) et les Corps Géniculés Latéraux (LGN) deviennent imageables (emplacements approximatifs). B. Coupe horizontale histologique à 490 μm d'un cerveau de macaque en coloration de Nissl présentant nos trois régions d'intérêt. (Source : Edward G. Jones depuis brainmaps.org). Notez que notre plan d'imagerie n'est ni coronal ni horizontal et que la correspondance entre notre imagerie et l'histologie n'est pas complète.

4.3. Imagerie fUS du primate éveillé en protocole de tâche visuelle

4.3.1. Présentation du SEF

Dans cette partie, nous allons imager la fonction cérébrale de primates éveillés exécutant une tâche. Nous nous intéressons à une zone particulière du cortex moteur : le *Supplementary Eye Field* (SEF) qui supervise les mouvements réflexes des yeux, appelés saccades (Pouget, 2015; Stuphorn et al., 2000). Le SEF intègre l'environnement du primate, ses buts et les potentielles règles comportementales liant

ses actions et leurs conséquences, afin de déclencher (via d'autres aires oculomotrices) des mouvements oculaires. Dans notre cas, les animaux sont entraînés à prendre la décision de fixer des yeux une cible ou d'en détourner le regard en fonction de sa couleur. Des travaux précédents ont montré l'activité induite dans le SEF par ces tâches en électrophysiologie (Stuphorn et al., 2010) et en IRMf (Baker et al., 2006; Koyama et al., 2004). Nous allons à notre tour imager le SEF en ultrasons fonctionnels au cours des mêmes tâches.



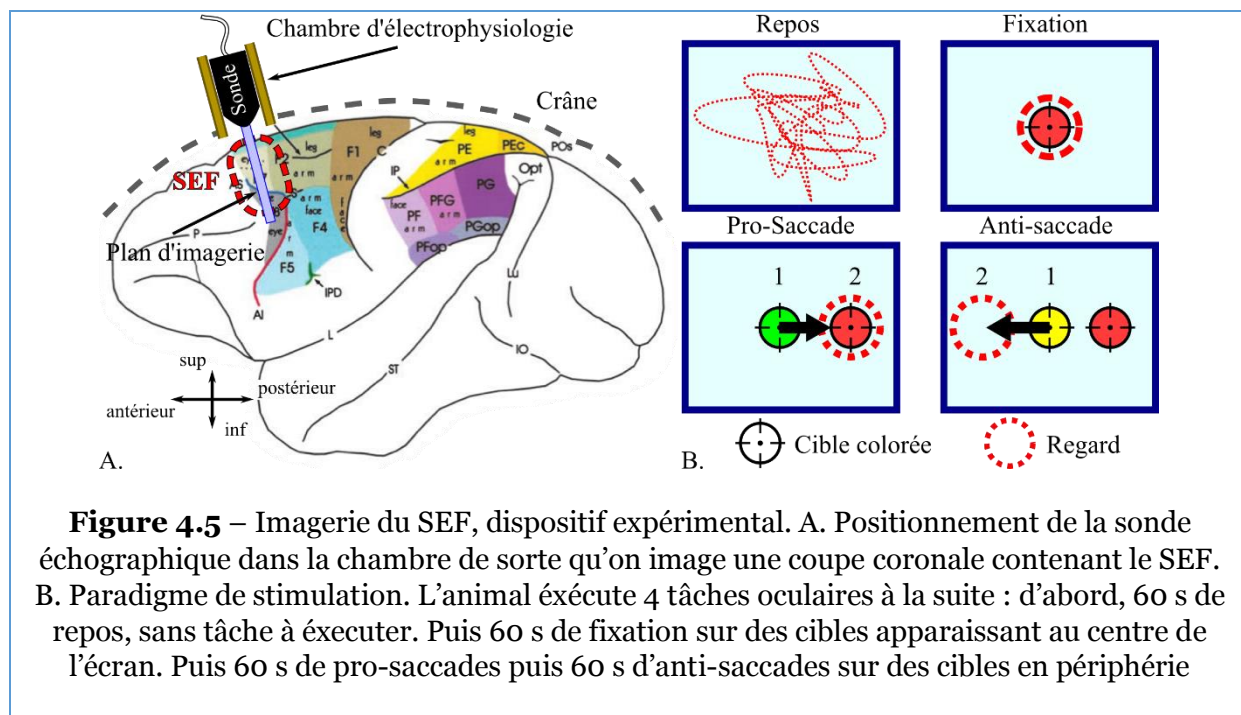
4.3.2. Matériel et méthode

4.3.2.1. Modèle animal

Les animaux utilisés ici sont deux macaques mâles, Y et S, nés en captivité. Leurs entraînements, les chirurgies et notre imagerie ont été conduites en respectant les directives européennes et ont été approuvées par le Comité Régional d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale (Protocole #541 et #5365, comité éthique Paris Darwin).

Pour notre protocole d'imagerie non-invasive, nous profitons d'une fenêtre crânienne circulaire à cheval sur les deux hémisphères qui a été réalisée au préalable pour des enregistrements chroniques en électrophysiologie du SEF. Cette fenêtre est protégée par une chambre cylindrique en plastique dont le diamètre est très légèrement supérieur à celui de notre sonde 15 MHz (18,5 mm). En plaçant simplement notre sonde dans cette chambre, nous pouvons imager le cerveau à travers le tissu conjonctif et la dure-mère. La distance entre notre sonde et le cortex est de 3 mm environ (**Figure 4.5A**). De plus, le SEF est une petite aire, en surface du cortex moteur, cette sonde est donc bien adaptée à l'imagerie. Nous pouvons ainsi réaliser l'imagerie fUS pendant que l'animal exécute ses tâches oculomotrices. Dans cette position, nous avons également

accès à une autre aire impliquée dans l'exécution des saccades : le Cortex Cingulaire Antérieur (CCA) (voir **Figure 4.4B** et **Figure 4.6**).



4.3.2.2. Stimuli – tâche/récompense

Les animaux sont assis dans une chaise à primate en face d'un écran, la tête maintenue immobile grâce à un implant en titane. Cet écran affiche les tâches oculaires à effectuer. Une session d'imagerie dure 4 minutes. Pendant ces 4 minutes, l'animal effectue tour à tour les 4 tâches qui lui sont présentées. Chaque tâche dure un peu plus d'une minute (voir **Figure 4.5B**) :

- « Tâche » de repos : L'écran est noir. L'animal n'effectue pas de tâche. Son regard est libre.
- Tâche de fixation : une cible rouge apparaît entre 700 ms et 1,2 s au centre de l'écran. L'animal doit fixer cette cible du regard. La tâche est répétée toutes les 2 à 3 secondes de sorte qu'une vingtaine d'essais soient réalisés pendant environ 60 s.
- Tâche de pro-saccade : une cible de fixation verte apparaît entre 700 ms et 1,2 s au centre de l'écran, 200 ms plus tard, une cible rouge apparaît pendant 1 s en périphérie, à 16° du champ visuel à gauche ou à droite (aléatoire). L'animal doit déclencher une saccade oculaire vers cette nouvelle cible. La tâche est répétée toutes les 2 à 3 secondes pendant 60 s environ.
- Tâche d'anti-saccade : une cible de fixation jaune apparaît entre 700 ms et 1,2 s au centre de l'écran, 200 ms plus tard, une cible rouge apparaît pendant 1 s en périphérie, à 16° du champ visuel à gauche ou à droite (aléatoire). Cette fois, l'animal doit déclencher une saccade oculaire dans la direction opposée à cette nouvelle cible. La tâche est répétée toutes les 2 à 3 secondes pendant 60 s environ.

Imagerie fUS de structures impliquées dans des traitements de l'information visuelle haut niveau chez le primate

Les yeux du singe sont filmés avec un traqueur infra-rouge (EyeLink 1000, SR Research ; Ottawa, Canada) qui permet de contrôler et d'enregistrer instantanément le succès de chaque essai et de donner une récompense liquide le cas échéant.

4.3.2.3. Imagerie fUS

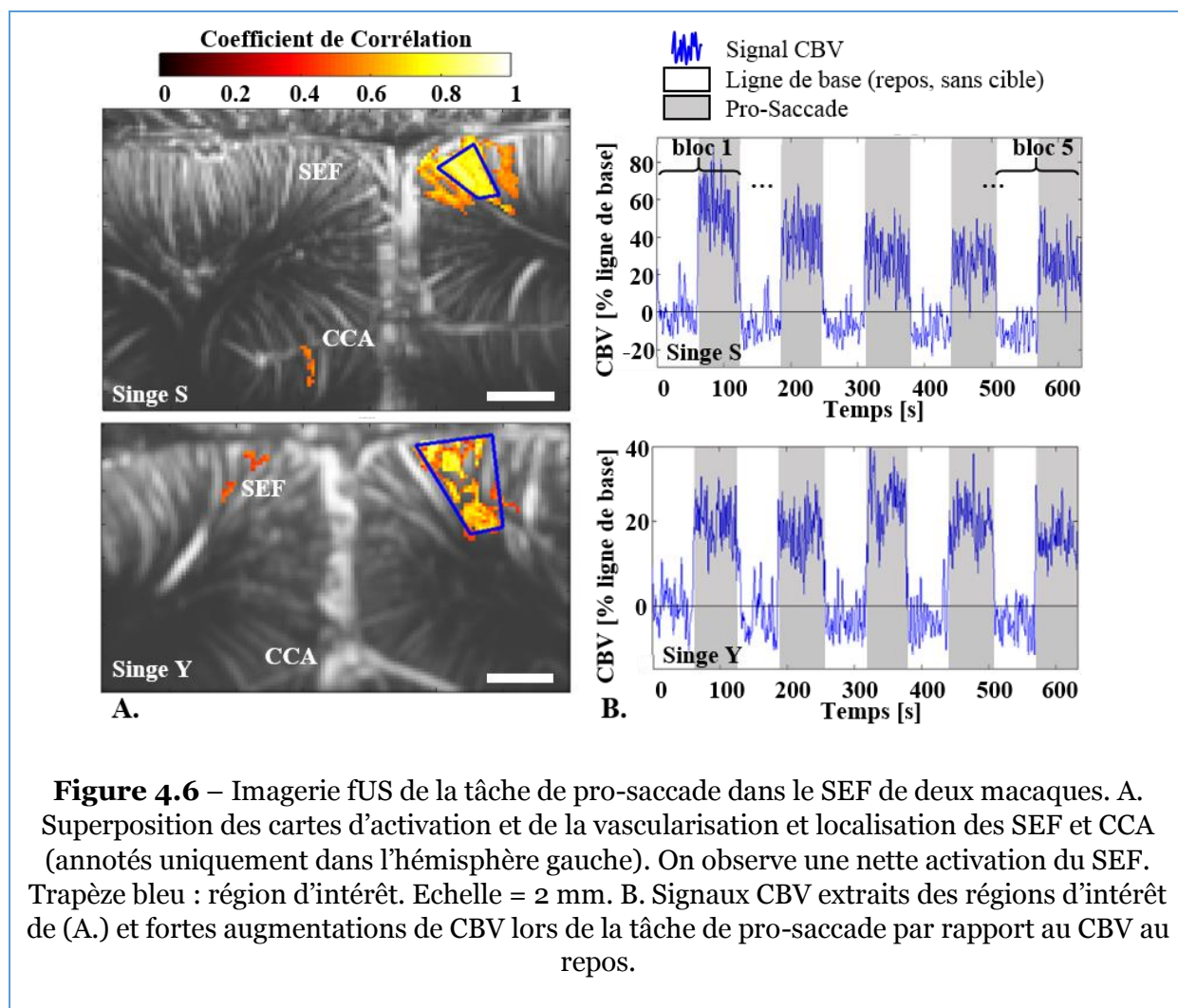
Une fois la sonde en place, on peut imager le cortex pendant que les animaux exécutent ces quatre tâches consécutives. On image pendant 300 s au total pour être certain d'imager les 4 tâches (qui durent chacun un peu plus de 60 s) et avoir 40 à 50 s de repos supplémentaire à la fin. Mise à part la durée, les paramètres d'imagerie sont les mêmes que ceux utilisés sur primates anesthésiés en 4.2.1.3 (1 image CBV par seconde, résultant de la somme incohérente de 500 images ultrasonores acquises en 1 s. Chaque image ultrasonore est la somme cohérente de 8 images en ondes planes avec des angles différents tirés à une PRF de 25k Hz). Nous répétons ce protocole d'imagerie de 300 s 5 fois par animal.

Avec ce jeu de 5 séries d'imageries, on peut comparer chacune des tâches entre elles et déterminer laquelle génère le plus d'activité cérébrale. Par exemple, pour comparer l'activité lors de la tâche de pro-saccade avec l'activité au repos, on procède de la façon suivante : grâce au suivi infra-rouge du regard et à la planification des tâches, on connaît les timings exacts de chaque tâche (qui font toujours un peu plus d'une minute). Dans les 5 imageries de 300 s, on extrait donc précisément le temps de film CBV acquis pendant le repos initial et le temps de film acquis pendant les pro-saccades. Ces deux portions durant chacune un peu plus d'une minute, on a alors 10 fois 60 s (environ) de film, que l'on concatène en alternant repos et pro-saccade. Ainsi, pour déterminer les zones activées par les pro-saccades, il suffit de corrélérer les pixels du film concaténé avec un créneau à l'état bas pendant le repos et à l'état haut pendant les pro-saccades. On profite également de disposer du timing précis de chaque essai de pro-saccade réussi ou raté pour enlever les portions de film entre 1 seconde avant et 2 secondes après les essais ratés, et on ajuste en conséquence le créneau de stimulus pour la corrélation.

On peut ainsi comparer chacune des tâches à la période de repos pour déterminer si elle active le SEF. Et on peut également comparer les tâches entre elles pour voir si certaines provoqueraient plus d'activité.

4.3.3. Résultats

La **Figure 4.6** présente le résultat de l'activité générée par les pro-saccades en comparaison des phases de repos. Seule la vascularisation du cortex est imagée ici, mais cela est néanmoins suffisant vu que le SEF est en surface. On observe une nette réponse CBV dans le SEF avec une bonne corrélation aux environs de 0,7 chez nos deux singes. Lorsqu'on extrait les signaux CBV du SEF, on constate une très forte augmentation CBV entre 20% et 35%, et pouvant aller jusqu'à 50% pendant les pro-saccades. De plus, on répète ce protocole sur nos mêmes deux singes à quelques jours d'intervalle (3 fois sur Y et 2 fois sur S) et cette activation se répète bien à chaque fois dans les mêmes zones et avec une amplitude de réponse comparable.



Les cartes d'activation et les courbes de CBV obtenues sont très similaires lorsqu'on compare fixation et repos, et anti-saccade et repos. En revanche, on mesure peu ou pas de différence significative en comparant les périodes de tâches entre elles. Notamment entre les tâches de pro-saccade et d'anti-saccade dans le cortex cingulaire antérieur (CCA) ou entre fixation et saccades dans le SEF comme on pourrait s'y attendre d'après (Ford et al., 2009) et (Baker et al., 2006; Koyama et al., 2004). Il est possible que notre paradigme de stimulation ne soit pas optimal pour cette comparaison. Dans ce cas, il faudrait peut-être répéter encore l'expérience ou privilégier un paradigme avec seulement quelques blocs de tâches à comparer se succédant plusieurs fois.

Le lecteur remarquera également qu'on observe principalement une activation du SEF dans l'hémisphère droit alors que les saccades sont faites aléatoirement à gauche et à droite. Contrairement à ce qu'on a vu avec nos stimuli sensoriels, ici, il ne devrait pas y avoir de latéralisation de la réponse. En effet, lors des études réalisées en électrophysiologie, les deux hémisphères présentent une activité quelle que soit la direction de la saccade. De fait, si on trace le CBV moyen dans le SEF de l'hémisphère gauche, on constate qu'il y a bien une augmentation CBV lors des tâches. Mais d'une dizaine de pourcents seulement. Cette réponse étant plus faible et plus proche du bruit

du signal, la corrélation résultante ne dépasse pas le seuil que nous imposons. Cette différence d'intensité, a toutefois été observée en IRMf (Baker et al., 2006; Koyama et al., 2004) mais dans des conditions différentes qui rendent la comparaison hasardeuse. En effet, dans ces études, on compare l'activité lors de saccades par rapport à une tâche de fixation, et l'activité observée ainsi dans le SEF est faible. Les raisons avancées par les auteurs sont le surentraînement de leurs singes et la petite taille du SEF qui ne permet pas d'y moyenniser les activités sur plusieurs singes. Une autre hypothèse est que dans le cas du fUS comme du fMRI, l'activité est macroscopique et dépend du nombre de neurones activés. Or l'électrophysiologie ne permet pas facilement d'estimer la taille d'une population de neurones puisqu'elle mesure l'activité de neurones uniques ou d'un proche voisinage (voir 1.3.1). Ainsi, peut-être que nos tâches stimulent le SEF dans les deux hémisphères mais qu'il y a moins de neurones activés du côté gauche, ce qui résulterait en une moins grande augmentation de CBV. L'existence chez l'humain des populations de gauchers et droitiers utilisant préférentiellement un hémisphère cérébral pour les tâches motrices soutient cette hypothèse.

Ainsi, nous ne pouvons, pour le moment, que formuler des spéculations pour expliquer cette différence d'activité CBV entre les SEF des deux hémisphères. Nous tâcherons de concevoir d'autres paradigmes de stimulation dans la suite du projet pour tenter d'éclaircir ce point.

4.4. Observer un évènement unique

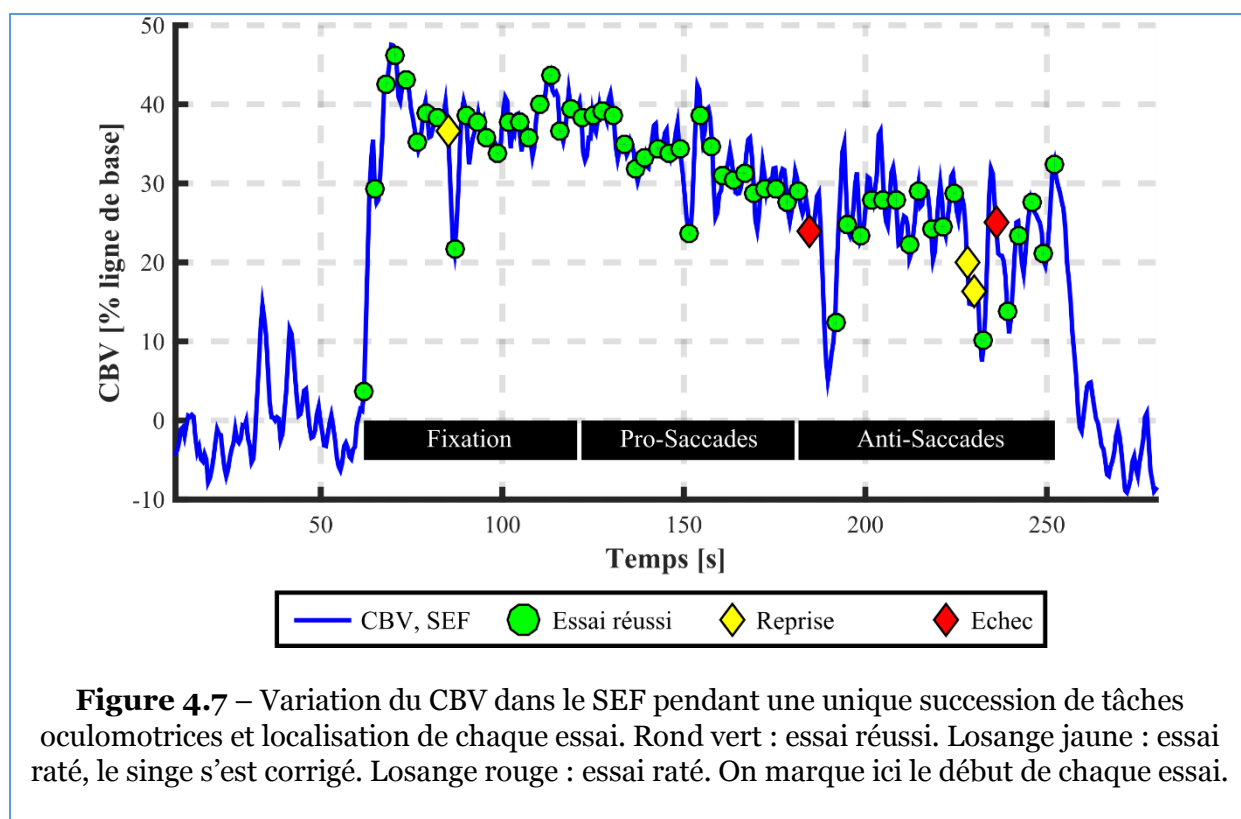
Les courbes et films CBV obtenus ici étant le résultat de la concaténation de tâches ne se suivant pas directement dans le temps, nous ne pouvons pas, ici, procéder à des analyses temporelles comme les mesures de délais entre réponses CBV proposées en 3.2.3.2 et 3.2.5.2. En revanche, comme nous avons localisé le SEF par son activation, il est possible de reprendre cette zone et de l'étudier au sein d'une session d'imagerie de 300 s avec nos 4 tâches différentes.

Dans un premier temps, reprenons la région d'intérêt matérialisée en bleu sur le singe S dans la **Figure 4.6A** et traçons le signal CBV moyen dans cette zone au cours d'une unique session d'imagerie avec la présentation de nos 4 tâches et superposons à ce signal chacun des essais (réussis, ratés, et les « reprises », *i.e.*, ceux où le singe s'est trompé puis s'est corrigé) (**Figure 4.7**). Sur la plupart des sessions d'imagerie, l'observation de ce signal révèle plusieurs choses intéressantes.

On peut dans un premier temps noter l'augmentation nette de CBV lorsque le singe passe de la phase de repos à la tâche de fixation, dès le premier essai qui lui est présenté. Comme on pouvait s'y attendre avec les comparaisons entre tâches menées au paragraphe précédent, le CBV reste à peu près constant pendant les tâches avec une légère décroissance peut-être due à une habituation de l'animal à la tâche.

Enfin, observons les erreurs faites par le singe. On peut les séparer en deux cas. Les « reprises », pour le cas où il s'est trompé mais s'en est aperçu et s'est corrigé pour exécuter la bonne opération, et les « échecs » pour les cas où il ne s'est pas corrigé. Lorsque le singe commet une erreur de ce type, le signal CBV du SEF décroît

rapidement dans les instants qui suivent, avant de remonter après un essai réussi. Grâce à l'imagerie fUS, on observe ici l'effet individuel et quasi-immédiat de ces évènements uniques sur la courbe CBV.



En revanche cette courbe ne dit rien sur les liens de causalité de cet évènement. En effet, on peut penser que le singe s'est aperçu de son erreur, ce qui a diminué l'activité cérébrale et donc le CBV. Ou alors, suite à une sorte de perte d'attention, l'activité électrique cérébrale diminue dans le SEF et le CBV diminue en même temps que l'animal se trompe.

Les travaux de Veit Stuphorn et de ses collaborateurs (Stuphorn et al., 2010, 2000) suggèrent que la première hypothèse est la bonne. En effet, ils ont démontré que le SEF ne contrôle pas les saccades mais qu'il les supervise. Ils se basent sur le fait qu'ils ont observé plusieurs populations de neurones dans le SEF, dont deux pertinentes ici. La première population est active lorsque le singe réalise qu'il a pris la bonne décision et qu'il aura donc sa récompense. C'est celle qui est donc responsable de l'augmentation de CBV que nous observons dès le début des tâches. Quant à la deuxième population, ils ont été baptisés les neurones « Oups ! » car ils sont actifs quand l'animal se rend compte qu'il a commis une erreur. Ainsi lorsque le singe se trompe, les neurones de la réussite s'éteignent pendant que les neurones « Oups ! » s'allument. Si la première population induit un couplage neurovasculaire plus fort que la seconde (si elle est plus importante en nombre par exemple), alors le niveau global de CBV de la zone va décroître. Aussi, nous prévoyons quelques travaux supplémentaires afin de confirmer cette dernière hypothèse et d'approfondir le sujet.

4.5. Conclusion du chapitre et perspectives

Au cours de ce chapitre, nous avons amené l'imagerie fUS vers un nouveau domaine : l'imagerie des primates non-humains anesthésiés puis éveillés alors que l'animal exécute une tâche comportementale.

Nous avons commencé par reproduire une imagerie fUS des fonctions visuelles du macaque anesthésié de façon analogue à ce que nous faisons sur des rats au chapitre 3. Nous avons vu que la réponse que nous enregistrons à la stimulation du cortex visuel est robuste et reproductible face à un stimulus supra-threshold. En revanche, notre sonde centrée à 15 MHz n'est plus adaptée lorsqu'il s'agit d'imager les fonctions plus profondes telles que les Corps Géniculés Latéraux (LGN) et le Colliculus Supérieur et qu'il faut alors utiliser une sonde plus basse fréquence.

Pour la première fois, nous avons ensuite montré qu'il était possible de réaliser une imagerie fUS du primate non-humain éveillé en train d'exécuter une tâche comportementale complexe bien plus simplement qu'en IRMf. Ainsi, nous avons retrouvé une activation bien connue du *Supplementary Eye Field* (SEF) lors de l'exécution de cette tâche de saccade oculaire. Nous avons même pu observer des réponses CBV essai par essai dans le SEF lorsque l'animal se trompe et s'en aperçoit, redémontrant ainsi l'existence des neurones « Oups ! ».

Ces résultats sont porteurs de nombreux espoirs pour la suite du projet. Ainsi, après avoir montré la faisabilité de l'imagerie de macaques éveillés, nous envisageons de complexifier ou de varier les tâches proposées afin d'affiner la compréhension du SEF et l'exécution des saccades oculaires, ou leur apprentissage. En miniaturisant encore notre sonde, nous pourrions réaliser simultanément des mesures en électrophysiologie et l'imagerie fUS. Ceci nous permettra, entre autres, de comprendre la différence d'intensité de réponse CBV entre les deux hémisphères ou de conclure définitivement sur ce qu'il se passe dans le SEF du primate lorsqu'il se trompe. Par ailleurs, la preuve que le fUS peut imager individuellement ce type d'évènements uniques, est riche de promesses car cela abolit une nouvelle frontière dans l'étude du cerveau. En effet, ces évènements ne sont, aujourd'hui pas détectables individuellement par IRMf ou électrophysiologie et nécessitent d'être répétés pour pouvoir mesurer des variations moyennes sur les grandeurs mesurées par ces technologies.

Forts de ce savoir-faire sur le primate non-humain éveillé, nous allons retourner à l'imagerie des fonctions visuelles (cortex visuel et sous cortical) du macaque éveillé. En variant les sondes nous pourrions étudier en détail cette fonction et pourrions alors examiner, en profondeur dans le cerveau, avec une précision inédite, l'organisation rétinotopique du primate. Nous pourrions aussi approfondir cette étude par l'imagerie de l'organisation colonnaire du cortex visuel du primate. Il a en effet été montré que dans le cortex visuel, certains neurones étaient sensibles à la direction du mouvement et que, au sein de ces neurones, chaque direction était traitée par différents neurones (Dräger, 1975). Chez le primate (mais pas chez le rat), ces neurones sont organisés en colonnes (Nolte, 2009; Wertz et al., 2015). Aujourd'hui, certaines techniques optiques comme l'imagerie bi-photons permettent d'étudier cette répartition dans le cortex. En revanche, aucune imagerie de ce type n'a encore jamais été réalisée dans les fonctions

Imagerie fUS de structures impliquées dans des traitements de l'information visuelle haut niveau chez le primate

plus profondes comme les LGN ou le colliculus supérieur par manque de profondeur ou de résolution. Le fUS devrait pouvoir réaliser cette première étude.

Enfin, dans la suite du projet, nous tâcherons d'imager la fonction visuelle de primates entraînés ayant reçu des implants rétinien ou une thérapie optogénétique (voir le 3.2.6). Dans un premier temps, si les implants (ou les opsines) sont uniquement sensibles aux infrarouges et que le singe réalise la tâche alors qu'elle est présentée en infrarouge, cela constituera une preuve supplémentaire de l'efficacité de la restauration visuelle. Dans un second temps, une imagerie fUS couplée à une mesure par électrophysiologie de tels primates en train de réaliser des tâches comportementales affectées par la présence de ces techniques de restauration visuelle permettra une étude très complète de ces thérapies et de la plasticité cérébrale.

4.6. Bibliographie

- Baker, J.T., Patel, G.H., Corbetta, M., Snyder, L.H., 2006. Distribution of Activity Across the Monkey Cerebral Cortical Surface , Thalamus and Midbrain during Rapid , Visually Guided Saccades. *Cereb. Cortex* 16, 447–459. doi:10.1093/cercor/bhi124
- Bakker, R., Tiesinga, P., Kötter, R., 2015. The Scalable Brain Atlas: Instant Web-Based Access to Public Brain Atlases and Related Content. *Neuroinformatics* 353–366. doi:10.1007/s12021-014-9258-x
- Dräger, U.C., 1975. Receptive Fields of Single Cells and Topography in Mouse Visual Cortex. *J. Comp. Neurol.* 160, 269–289. doi:10.1002/cne.901600302
- Ford, K.A., Gati, J.S., Menon, R.S., Everling, S., 2009. BOLD fMRI activation for anti-saccades in nonhuman primates. *Neuroimage* 45, 470–476. doi:10.1016/j.neuroimage.2008.12.009
- Koyama, M., Hasegawa, I., Osada, T., Adachi, Y., Nakahara, K., Miyashita, Y., 2004. Functional Magnetic Resonance Imaging of Macaque Monkeys Performing Visually Guided Saccade Tasks: Comparison of Cortical Eye Fields with Humans. *Neuron* 41, 795–807. doi:https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00047-9
- Nolte, J., 2009. *The Human Brain: An Introduction to Its Functional Anatomy*.
- Pouget, P., 2015. The cortex is in overall control of “ voluntary ” eye movement. *Eye* 241–245. doi:10.1038/eye.2014.284
- Stuphorn, V., Brown, J.W., Schall, J.D., 2010. Role of Supplementary Eye Field in Saccade Initiation: Executive , Not Direct , Control. *J. Neurophysiol.* 103, 801–816. doi:10.1152/jn.00221.2009.
- Stuphorn, V., Taylor, T.L., Schall, J.D., 2000. Performance monitoring by the supplementary eye field. *Nature* 408, 857–860. doi:10.1038/35048576
- Wertz, A., Trenholm, S., Yonehara, K., Hillier, D., Raics, Z., Leinweber, M., Szalay, G., Ghanem, A., Keller, G., Rózsa, B., Conzelmann, K., Roska, B., 2015. Single-cell-initiated monosynaptic tracing reveals layer-specific cortical network modules. *Science* (80-.). 349, 70–74.

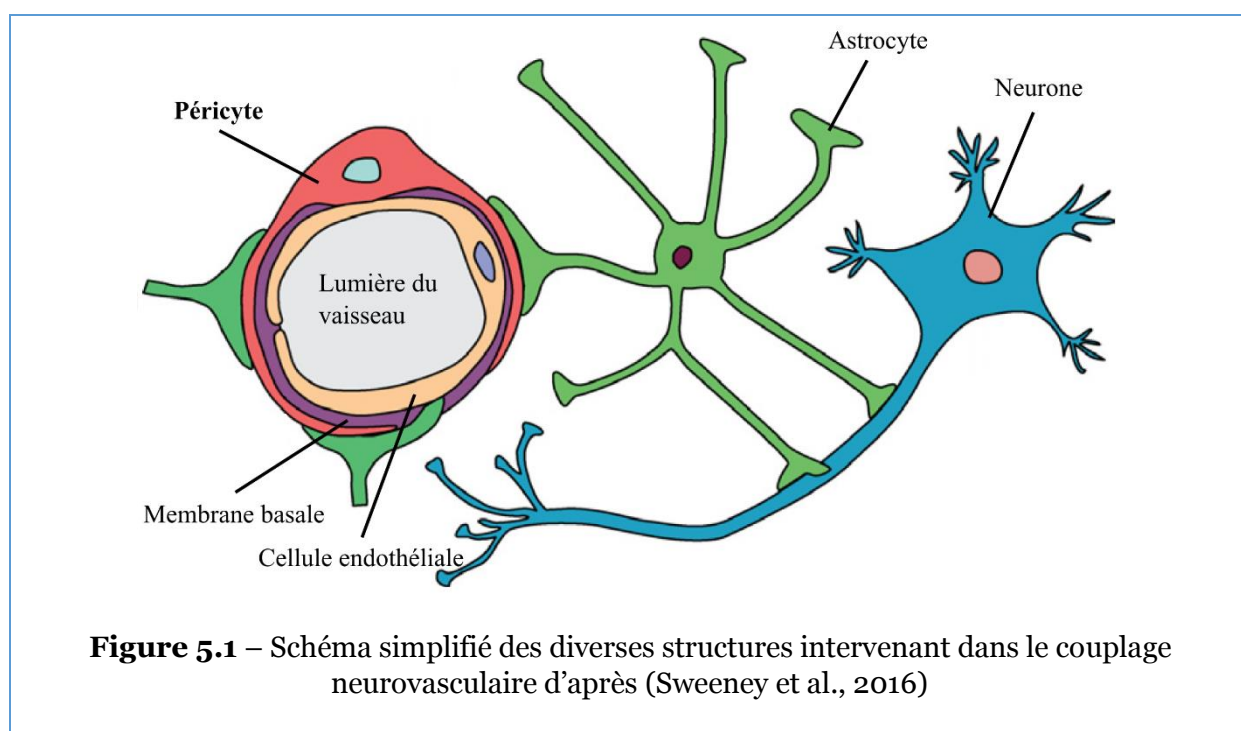
5. Le fUS comme outil de suivi thérapeutique

Dans ce chapitre, nous utilisons les outils développés au cours des chapitres précédents pour les appliquer sur une échelle de temps, non plus de quelques minutes, mais de quelques semaines. Afin d'étudier l'efficacité de molécules agissant sur le réseau vasculaire et les flux sanguins dans le cadre d'études précliniques.

5.1. Introduction : Les péricytes et le couplage neurovasculaire

Avant de rentrer dans le vif du sujet, il est nécessaire de fournir quelques compléments d'information simples sur le couplage neurovasculaire et les différentes structures intervenant dans les interactions entre les neurones et les capillaires sanguins dans le cerveau (résumées **Figure 5.1**). Ces interactions font principalement intervenir deux types de cellules : les astrocytes et les péricytes.

Le maintien du métabolisme des neurones ainsi que sa « communication » avec le capillaire sanguin se font par l'intermédiaire des astrocytes. Quant aux péricytes, il s'agit de cellules juxtaposées aux cellules endothéliales qui forment le tube vasculaire et qui sont pourvues de prolongements cytoplasmiques qui forment des contacts étroits avec le capillaire sanguin. Au niveau des artérioles et des capillaires post-artériolaires, leurs capacités contractiles permettent de réguler le diamètre des capillaires sanguins. Ainsi au repos les vaisseaux sont légèrement contraints, et lors du couplage neurovasculaire, les péricytes se relâchent permettant l'augmentation du volume de sang et donc de l'approvisionnement en oxygène du neurone.



Les péricytes et les astrocytes jouent également de nombreuses autres fonctions, telles que la régulation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou encore l'apport de facteurs trophiques aux cellules neuronales, ces fonctions essentielles ne seront cependant pas abordées ici pour des raisons de simplification.

Nous étudierons ici deux modèles de défauts d'interaction entre cellules endothéliales et péricytes et les conséquences sur la régulation du flux sanguin cérébral, et nous

testerons les effets de la Thalidomide, une molécule capable de stimuler la maturation des capillaires sanguins par notre technique de Doppler de puissance.

5.2. Matériels et Méthodes

5.2.1. Modèles animaux

Nous allons nous intéresser à deux traitements différents devant affecter les péricytes. Nous menons cette étude grâce à deux lots de souris différents. Nous utiliserons régulièrement les termes d'expérimentation et de protocoles « aiguë » et « chronique ». De manière analogue à leur emploi pour désigner des douleurs ou une toxicité, le premier désigne un protocole dans lequel chaque animal n'est anesthésié et imagé qu'une fois tandis que le second désigne un protocole où chaque animal peut être anesthésié plusieurs fois au cours d'un protocole durant généralement plusieurs jours ou semaines.

5.2.1.1. Protocole aiguë, avec irradiation

Le premier lot est un lot de 18 souris mâles de 11 semaines pesant entre 20 et 26 g de la souche C57BL/6 fournies par Janvier Labs (France). A 10 semaines, 10 d'entre elles ont subi une irradiation localisée du cerveau. Pour ce faire, elles sont anesthésiées pendant 30 minutes (isoflurane à 2%, air 1 L/min, oxygène 1 L/min). Pendant ce temps, elles sont placées dans un berceau d'irradiation sous un générateur de rayons X (220 kV, 13 mA) permettant cette irradiation localisée grâce à un scanner réalisé au préalable. La dose déposée par ce rayonnement ionisant est de 22,3 Gy. L'irradiation induit un détachement des péricytes de l'endothélium des capillaires cérébraux avec pour conséquences l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique et l'augmentation du diamètre des capillaires sanguins. Par la suite, on réalisera une imagerie de toutes ces souris, le même jour, afin de déterminer s'il existe une différence de CBV significative entre le groupe de souris irradiées et le groupe de souris saines.

5.2.1.2. Protocole chronique sur souris mutantes

Le deuxième lot est un lot de 10 souris mâles transgéniques dérivées de la souche C57BL/6 fournies par Janvier Labs (France) de 17 semaines. Ces souris, (génotype $Eng^{F/F}$; $Cdh5CreERT2$; $NG2DsRedBAC$) présentent deux avantages :

- L'inactivation spécifique du gène *Eng* au niveau des cellules endothéliales, qui peut être induite par injection intrapéritonéale de Tamoxifen (2,5 mg dilués dans 75 μ L de cornoil et 25 μ L d'éthanol à 100%, 1 injection par jour pendant 5 jours, synthétisé par un laboratoire partenaire). Le gène *Eng* code pour le récepteur « endogline » présent à la surface des cellules endothéliales. Il s'agit d'un récepteur de type III de la signalisation TGF- β /BMP connu pour réguler l'angiogenèse (la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau

vasculaire existant). Des mutations sur le gène *ENG* sont responsables de la maladie de Rendu-Osler caractérisée par des angiodyplasies et des saignements sévères et fréquents. Endogline régule également l'interaction entre les cellules endothéliales et les péricytes. L'inactivation de ce gène induit chez la souris un détachement des péricytes des capillaires sanguins. Après l'induction, on devrait donc observer une différence de CBV par Doppler de puissance.

- La possibilité de visualiser les péricytes en rouge par microscopie 2-photons. Ce qui permettra à un laboratoire partenaire de valider nos observations macroscopiques du CBV.

On veut ensuite tester l'hypothèse que l'injection de Thalidomide restaure la fonction péricytaire (Lebrin et al., 2010). Les 10 souris sont donc séparées en 2 groupes de 5. Le premier reçoit des injections intrapéritonéales de Thalidomide (25 mg dilués dans 100 µL de DMSO, 6 injections, espacées de 48h, synthétisé par un laboratoire partenaire), le second groupe reçoit des injections d'un analogue, le Lénalidomide (même dosage, même laboratoire), qui n'a pas d'effet sur les péricytes mais a les mêmes effets anti-inflammatoires et cytotoxiques. Après cette série d'injections, on espère observer par ultrasons des différences de CBV entre les deux groupes et par rapport à avant le traitement.

Pour cette étude, ce lot de mutants est donc suivi pendant 5 semaines selon le protocole suivant :

- S1 : Imagerie par ultrasons n°1.
- S2 : Induction de la mutation par injection de Tamoxifen.
- S3 : Imagerie par ultrasons n°2. Séparation en 2 groupes (groupe T et L). Début des traitements au Thalidomide (groupe T) et au Lénalidomide (groupe L).
- S4 : Suite des traitements.
- S5 : Fin des traitements. Imagerie par ultrasons n°3.

Dans tous les cas, les souris sont hébergées à deux ou quatre par cage, avec eau et nourriture en libre accès et maintenues dans des conditions standards (cycles jour/nuit de 12/12 h à une température de 22°C). Nos expériences ont été conduites en respectant les directives européennes (2010/63/EU) et le protocole expérimental approuvé par le Comité Régional d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale.

Pour chaque imagerie, les souris sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale de kétamine (100 mg/kg, Imalgene 1000®, Merial ; France) et de médétomidine (1 mg/kg, Domitor®, Pfizer Santé Animal ; France). Elles sont ensuite placées dans un cadre stéréotaxique. Les poils du crâne sont tondus puis épilés (Crème dépilatoire « peaux sensibles » Klorane ; France). Après cette épilation, il est possible d'imager le cerveau de la souris sans chirurgie, de manière non-invasive (Tiran et al., 2017). Du gel échographique est déposé sur le crâne, puis on peut procéder à l'imagerie ultrasonore. A l'issue de l'imagerie, l'animal est réveillé par une injection intrapéritonéale de 50 µL de solution d'un antagoniste de la médétomidine (Antisédan®, Vétoquinol ; France). Au total, le temps d'anesthésie comprenant la préparation de l'animal, son installation, son épilation et son imagerie dure 1h afin de ne pas trop l'affaiblir. Durant tout ce temps sa température est maintenue à 36°C à l'aide d'un tapis chauffant, d'une couverture et

d'une sonde rectale. Afin d'éviter toute inflammation, les barres d'oreille du cadre stéréotaxique et la sonde rectale sont enduites d'un gel de Xylocaïne 2%.

5.2.2. Séquence d'imagerie

Contrairement à tout ce que nous avons fait jusqu'à présent, nous ne cherchons pas à détecter des variations de CBV à l'échelle de quelques secondes mais de plusieurs jours ou entre souris. Ainsi pour chaque souris, à chaque séance on va mesurer une carte CBV moyenne et comparer l'évolution de ces cartes entre les souris et les séances.

Pour ce faire, une sonde échographique centrée à 15 MHz (128 éléments, pas 110 μm , focale en élévation 8 mm, Vermon ; Tours, France), pilotée par un échographe ultrarapide (Verasonics ; Kirkland, USA) est utilisée pour cette étude. La sonde est montée sur le jeu de moteurs quatre axes décrit précédemment (voir 3.1.4). On réalise des cartes CBV dans 51 plans coronaux distants de 100 μm et couvrant 5 mm au total. Puisque la peau est conservée sur le crâne, nous ne disposons pas des repères stéréotaxiques lambda et bregma. Ainsi nous fixons la limite postérieure de la zone que nous imageons par une coupe coronale facilement repérable visuellement et située à l'arrière du cerveau approximativement en Bregma -4 mm (voir **Figure 5.2A-B**).

Dans chaque plan d'imagerie, on réalise 3 images CBV. Chaque image CBV est la somme incohérente de 200 images échographiques filtrées par SVD acquises à 750 Hz en 267 ms. Chaque image échographique est la somme cohérente de 11 images en ondes planes acquises à la PRF de 25 kHz avec des angles d'émission différents allant de -10° à 10° par pas de 2° . Les 3 images CBV de chaque plan sont moyennées entre elles.

Ce balayage prend 2 à 4 minutes. On peut ainsi réaliser jusqu'à 10 balayages de ce type par souris pendant le temps imparti à l'imagerie.

5.2.3. Séparation des flux

Dans un premier temps, nous étudions les variations de CBV. Mais par la suite, nous allons affiner l'analyse et voir si nous observons des effets moins globaux. Nous proposons en 3.3.1.3 un filtrage tel que les images CBV obtenues ne contiennent que les contributions au CBV des « gros vaisseaux » (artérioles et veinules), des capillaires ou encore des flux sanguins montants et descendants. En reprenant cette méthode, pour chaque balayage, nous réalisons, une carte CBV globale, une carte CBV pour les capillaires, une carte pour la contribution des « gros » vaisseaux, une carte CBV pour les flux montants (veinules et capillaires veineux), et une pour les flux descendants (artérioles et capillaire artériolaires).

En outre, nous souhaitons enrichir notre quantification des variations de flux sanguins. En plus de nos mesures de CBV, nous souhaitons mesurer les vitesses axiales des flux sanguins. Pour rappel, le premier quantifie le nombre d'hématies dans un pixel, tandis que la seconde quantifie leur vitesse axiale. Pour quantifier la vitesse des flux, nous utilisons une métrique différente : la vitesse moyenne qui peut s'obtenir à partir de la fréquence moyenne \hat{f}_d du spectre Doppler $\tilde{S}_D(f)$:

$$\hat{f}_d = \frac{\int f |\tilde{S}_D(f)|^2 df}{\int |\tilde{S}_D(f)|^2 df} \quad (5.1)$$

Dans notre cas, on peut avoir au sein d'un pixel des flux montants et descendants qui s'annuleraient dans l'estimateur ci-dessus. C'est pourquoi nous utilisons plutôt ce qu'on pourrait appeler une « fréquence absolue moyenne » :

$$\hat{f}_d = \frac{\int |f| |\tilde{S}_D(f)|^2 df}{\int |\tilde{S}_D(f)|^2 df} \quad (5.2)$$

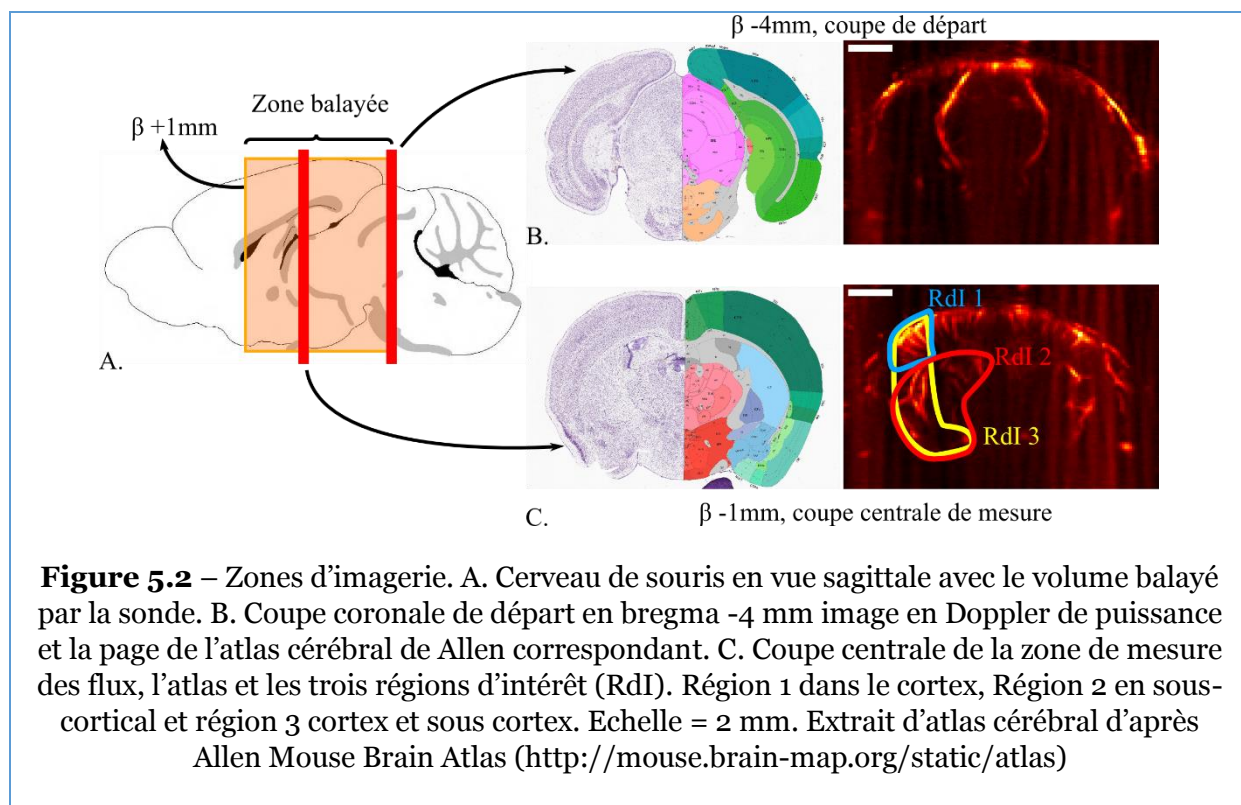
La vitesse axiale moyenne peut ensuite être calculée à partir de \hat{f}_d et de la formule de l'effet Doppler (équation (1.1)). La combinaison de cette mesure à celle du CBV nous permettra, via un raisonnement en ordre de grandeur, d'en déduire les variations du rayon des vaisseaux sanguins.

5.2.4. Standardisation du placement et zones d'intérêt

Avec notre méthode, nous ne mesurons pas directement le CBV, mais un signal électrique proportionnel au CBV. Ce signal est finalement le produit du CBV et de l'amplitude du signal acoustique. Ce signal est émis par la sonde puis voyage jusqu'aux vaisseaux sanguins, est rétrodiffusé par le sang, fait le voyage retour et finalement est reçu par la sonde. A chacune de ces étapes, l'amplitude du signal peut être affectée sans pour autant que le véritable CBV ait varié. Il est donc important d'identifier l'origine de ces variations parasites d'amplitude et de s'en affranchir ou de les limiter.

Il est assez simple de s'affranchir des variations liées à l'émission et à la réception des signaux. En effet, il suffit d'utiliser toujours le même matériel pour l'échographie avec la même séquence d'émission/réception. En revanche, tout ce que l'onde peut vivre sur son trajet entre la sonde et le diffuseur peut affecter son amplitude. Ainsi, d'une séance d'imagerie à l'autre il faut s'assurer que :

- La sonde est toujours à la même distance du cerveau de l'animal. En effet, à cause de l'atténuation en profondeur et de la focalisation du faisceau ultrasonore, le signal reçu par un diffuseur, et donc celui rétrodiffusé, varie si la position de ce diffuseur par rapport à la sonde varie. Nous corrigeons cette distance avant le début des balayages grâce à un mode d'imagerie en temps réel.
- Les obstacles entre la sonde et le diffuseur doivent toujours être les mêmes. Dans notre cas, les ultrasons doivent traverser la peau et le crâne de la souris. Si le crâne s'épaissit entre 2 séances d'imageries ou si son inclinaison par rapport à la sonde n'est pas la même, l'amplitude du signal transmis à travers celui-ci ne sera pas la même non plus. Il faut donc être vigilant lors du placement de l'animal dans le cadre stéréotaxique.



Après l'imagerie, vient le moment de choisir une zone dans laquelle on mesure les flux sanguins. On constate que d'une souris à l'autre, la qualité des images est variable. Cependant, on trouve une zone presque toujours propre vers bregma -1 mm (**Figure 5.2C**). Dans cette coupe, on définit 3 régions d'intérêt dans l'hémisphère gauche. Une dans le cortex (région 1), une contenant les aires sous-corticales (région 2) et une prenant un peu des deux (région 3). Ces régions sont étendues hors de la coupe afin d'augmenter le nombre de points de mesure. Ainsi, ces régions sont sécantes avec les 8 autres coupes autour de la coupe bregma -1 mm. Ainsi, pour chaque balayage, on retrouve visuellement cette coupe de mesure. On délimite ensuite à la main la région d'intérêt. Puis dans chacun de ses voxels, on calcule les différents estimateurs de flux sanguins décrits en 5.2.3. La moyenne sur tous ces voxels est ensuite calculée pour n'avoir qu'une seule valeur par estimateur. On peut ainsi voir s'il y a eu des variations de CBV au cours de la séance d'imagerie, à cause de l'anesthésie, par exemple. Nous avons globalement peu de variations au cours de la séance. Ainsi, on moyenne ces valeurs sur la dizaine de balayages afin d'avoir une valeur unique de chaque estimateur par souris et par jour.

5.3. Résultats

5.3.1. Souris irradiées en aiguë

Commençons par présenter les résultats du protocole d'imagerie en aiguë comparant des souris saines et des souris irradiées. Ce protocole est plus simple et permet de tester notre méthode d'imagerie sans la complexité de l'expérimentation chronique.

5.3.1.1. Augmentation générale du CBV

Commençons par une simple observation des cartes CBV (**Figure 5.3A-C**). Une simple comparaison visuelle révèle plus de CBV et une architecture vasculaire plus intense chez les souris irradiées.

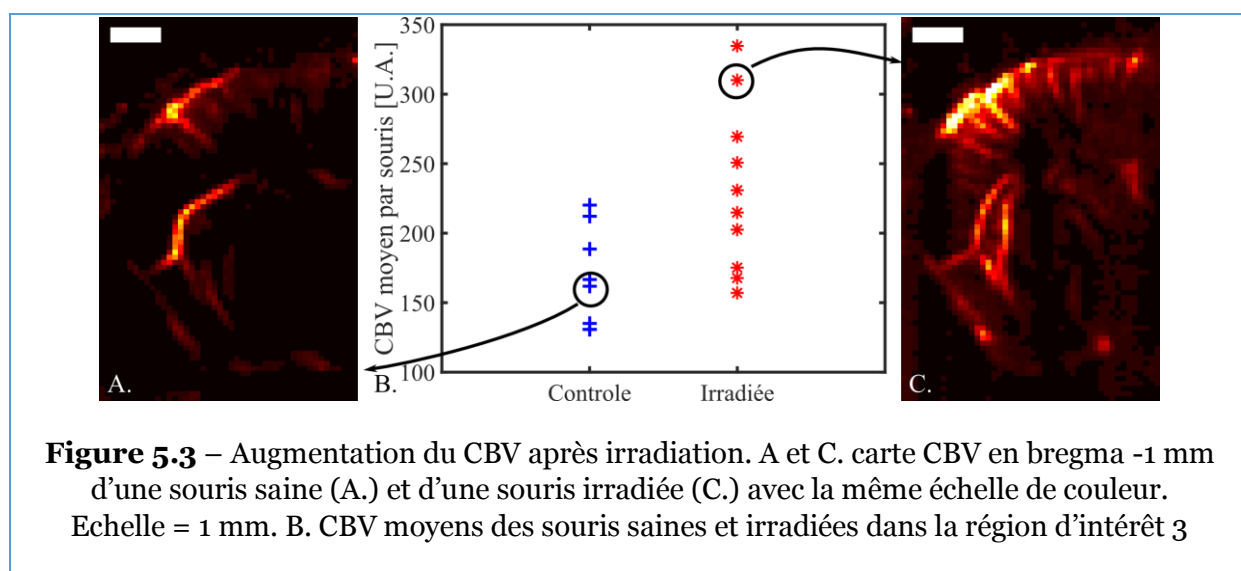
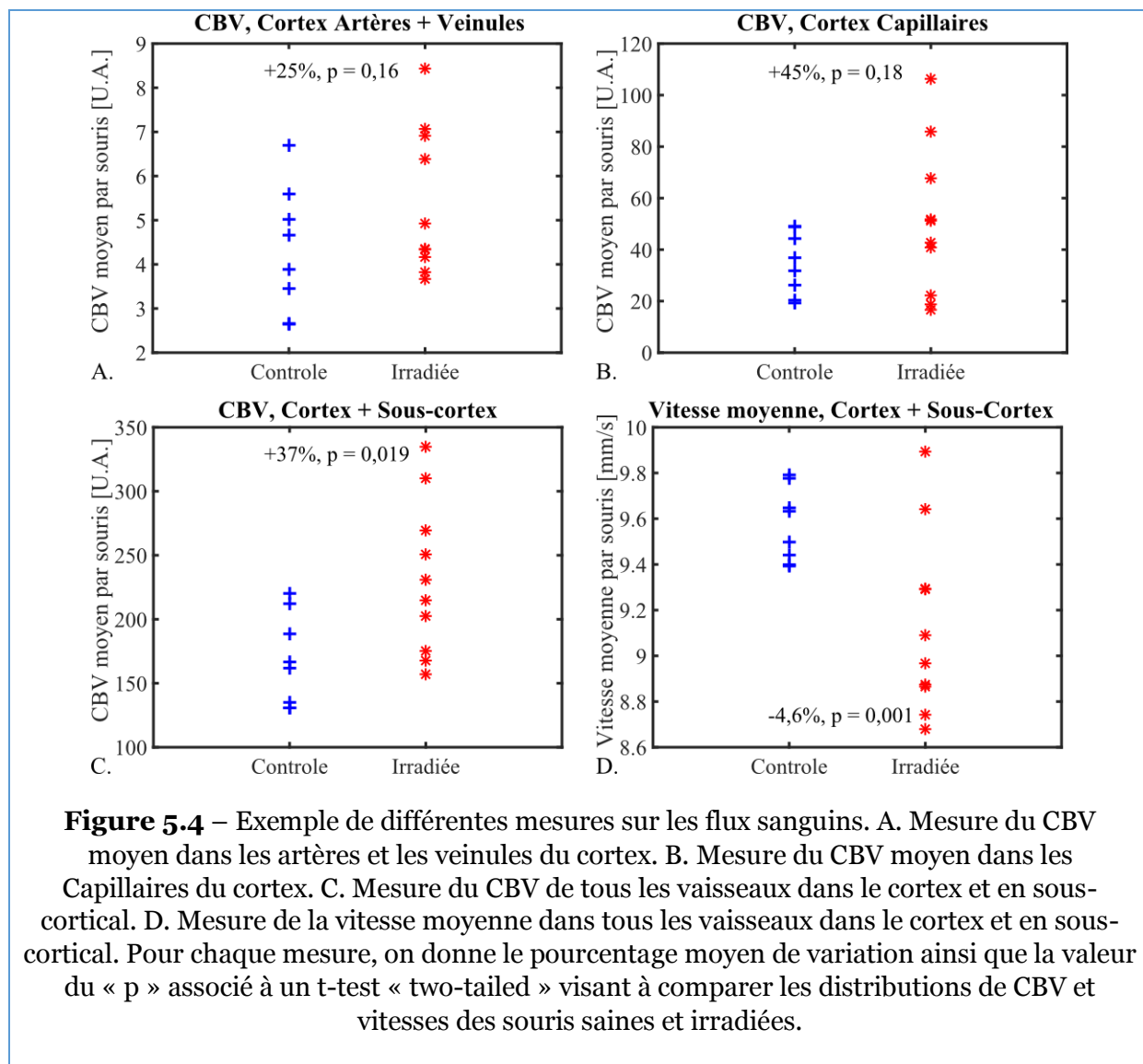


Figure 5.3 – Augmentation du CBV après irradiation. A et C. carte CBV en bregma -1 mm d'une souris saine (A.) et d'une souris irradiée (C.) avec la même échelle de couleur. Echelle = 1 mm. B. CBV moyens des souris saines et irradiées dans la région d'intérêt 3

Pour une approche plus quantitative, on trace les CBV moyens extraits de la région d'intérêt n°3 pour toutes les souris (**Figure 5.3B**). Cette figure révèle que le CBV moyen chez les souris irradiées, peut dans certains cas être plus de deux fois plus élevé que chez les souris saines. Sur l'ensemble des souris, on constate que les souris irradiées ont, en moyenne, un CBV 37% plus élevé ($p = 0,019$, « two-tailed t-test »). De plus, sur les cartes CBV, cette augmentation semble un phénomène général dans le cerveau. Pour s'en assurer, on trace les CBV moyens de toutes les souris, mais extraits des régions d'intérêt 1 et 2, et on constate les mêmes variations de CBV. L'effet de l'irradiation se retrouve aussi bien dans le cortex que dans les structures sous-corticales.

5.3.1.2. En variant les zones et les estimateurs

Varions maintenant les mesures effectuées sur ces souris. La **Figure 5.4** présente quatre exemples de mesures différentes. On constate par exemple (**Figure 5.4A et B**) que l'irradiation augmente le CBV cortical aussi bien dans les « gros » vaisseaux, artérioles et veinules que dans les capillaires. Il semble toutefois que l'augmentation du CBV capillaire soit plus importante.



On constate également que mesurer le CBV ou la vitesse moyenne des flux sanguins ne donne pas le même résultat. Ainsi (**Figure 5.4C et D**), dans la région d'intérêt n°3, on constate que l'irradiation a pour effet d'augmenter le CBV mais aussi de diminuer la vitesse moyenne du sang. Pour expliquer ceci, on peut tenter un bref raisonnement en loi d'échelle :

Considérons un vaisseau sanguin de rayon R et de longueur L avant et après irradiation. Rappelons que l'irradiation détache les péricytes des vaisseaux sanguins

cérébraux, ce qui a pour conséquence une augmentation de leur rayon. On peut également faire l'hypothèse que le métabolisme du cerveau et des neurones n'est pas affecté par l'irradiation et que la concentration en nutriments du sang reste la même. Dès lors pour conserver ce métabolisme, il est nécessaire que le débit sanguin D soit conservé. Donc, on a d'une part, un CBV qui peut s'approximer en :

$$CBV \sim R^2 L \quad (5.3)$$

Et un débit :

$$D \sim v_m R^2 \quad (5.4)$$

Où v_m est la vitesse moyenne du sang, et qui s'approche donc par :

$$v_m \sim \frac{D}{R^2} \quad (5.5)$$

Ainsi, l'hypothèse de conservation du métabolisme cérébral et donc du débit sanguin, impose que l'irradiation augmente le CBV et diminue la vitesse moyenne. En partant d'une augmentation de CBV typique de nos expérimentations, *i.e.* d'environ 30%, une application numérique grossière, nous donne une augmentation du rayon des vaisseaux sanguins de 15% et une diminution de la vitesse de 25%. Ces variations de rayons correspondent à ce qui a été observé dans la littérature scientifique (Hamilton et al., 2010; Peppiatt et al., 2006). Mais la diminution de vitesse observée sur la **Figure 5.4D** est plutôt de l'ordre de 5%. Ainsi, notre modèle simpliste permet facilement de comprendre la tendance observée. En revanche il peine encore à d'expliquer proprement la réalité. Il est par exemple probable que le détachement des péricytes change la résistivité des vaisseaux, affectant alors le débit sanguin.

Nous testons ensuite nos deux estimateurs des flux sanguins dans les différentes régions d'intérêt et en séparant les influences des capillaires, artérioles et veinules. Le résumé de ces mesures est présenté sur la **Figure 5.5**. On remarque notamment que la mesure en CBV révèle une augmentation quel que soit le cas étudié : l'augmentation de CBV est rencontrée dans toutes les régions du cerveau, et il semblerait qu'elle soit plus importante dans les capillaires (+40-50%) que dans les artérioles et veinules (+20-30%). Ce qui est cohérent avec le fait que l'irradiation vise principalement les péricytes attachés aux capillaires. En revanche la diminution de vitesse moyenne dont nous parlions plus haut n'est observable que dans les artérioles et les veinules. Cette observation peut autant être due à l'imperfection de notre modèle qu'à une sensibilité trop faible pour la détection de flux dans les plus petits vaisseaux. En effet, la contribution acoustique des capillaires étant partiellement filtrée par l'opération de SVD (voir 3.2.5.1, **Figure 3.12**), le signal résultant est très faible. L'estimateur de la vitesse moyenne que nous avons choisi est par ailleurs plus sensible au bruit que celui choisi pour le CBV qui est plus adapté à l'imagerie des petits vaisseaux (Macé et al., 2013; Rubin et al., 1994). Il est donc possible qu'on n'observe pas de variation de vitesse moyenne dans les capillaires parce que le signal y est trop bruité.

	CBV			Vitesse moyenne		
Cortex	V ↑ +23% p=0,19	A ↑ +25% p=0,16	Cap ↑ +45% p=0,18	V ↓ -1,7% P=0,04	A ↓ -1,5% p=0,18	Cap ~ p=0,77
Sous-Cortical	A + V ↑ +20%, p=0,10		Cap ↑ +38% p=0,18	A + V ↓ -1,1%, p=0,003		Cap ~ p=0,79
cerveau	A + V ↑ +33%, p=0,03		Cap ↑ +57% p=0,12	A + V ↓ -1,6%, p=0,006		Cap ~ p=0,81

Figure 5.5 – Tableau récapitulatif des effets de l’irradiation observés dans les 3 régions d’intérêt : corticale, sous-corticale et les deux en même temps, mesurés par une estimation du CBV ou de la vitesse moyenne des flux sanguins. L’estimation est faite dans les artérioles (A), les veinules (V), ou les deux (A+V), et les capillaires (Cap). Suivant les cas, on observe une augmentation (↑), une diminution (↓) ou pas d’effet observable (~). Pour chaque cas, on donne le pourcentage de variation moyen entre souris saines et irradiées ainsi que la valeur du « p » du t-test « two-tailed » visant à comparer ces deux distributions. Notez que la séparation entre artérioles et veinules n’est possible que dans le cortex dont on connaît l’organisation a priori (voir 3.2.5.1). En sous-cortical et dans tout le cerveau, on ne sépare donc pas leurs contributions.

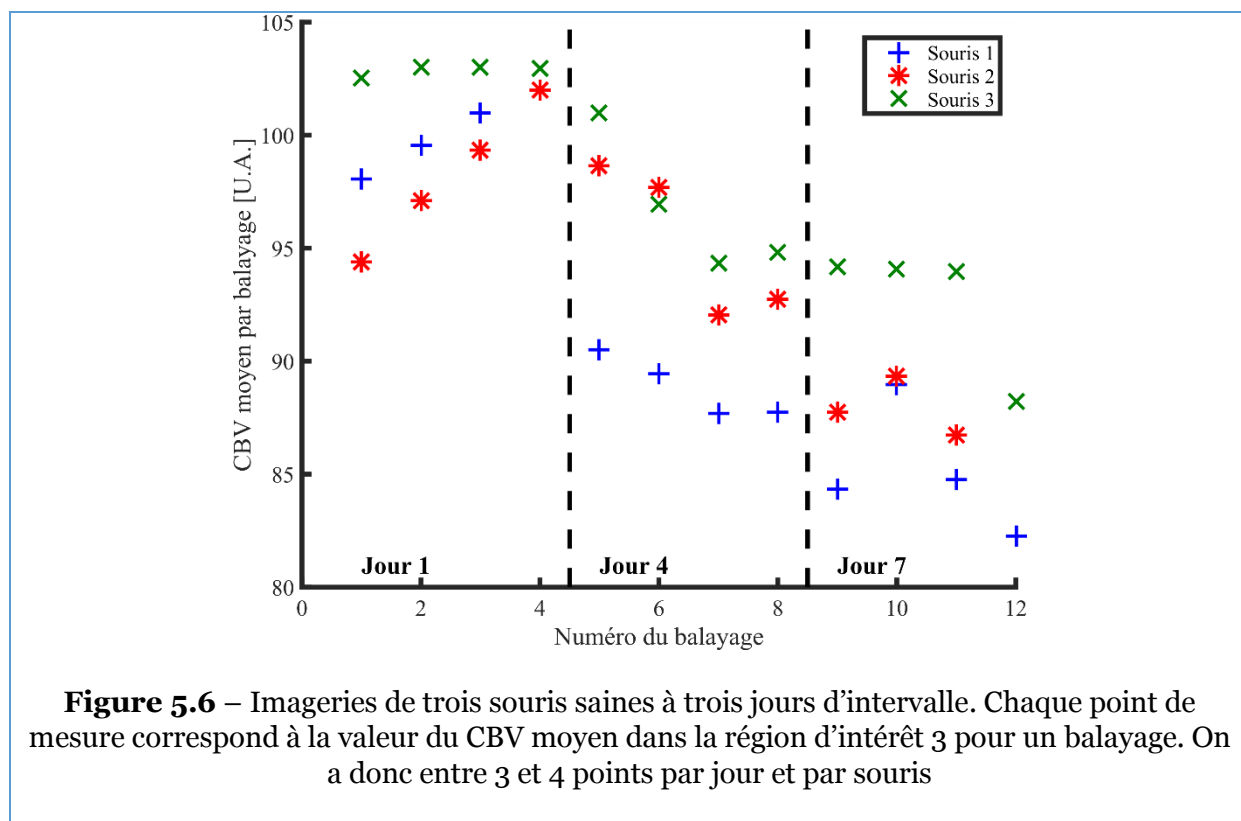
Nous démontrons, ici qu’il est possible d’utiliser l’imagerie en Doppler de puissance et les outils dérivés de l’imagerie fUS pour séparer, en aiguë, deux groupes de souris dont les flux sanguins ont été affectés par un défaut de la fonction péricytaire.

5.3.2. Souris saines en chronique

Avant de s’engager dans le long protocole chronique vérifions que nous sommes capables d’imager des souris saines plusieurs fois à quelques jours d’intervalle sans observer de différence significative.

Pour cette rapide étude, nous utilisons 3 souris mâles de 8 semaines pesant $23 \pm 0,5$ g de la souche C57BL/6 fournies par Janvier Labs (France). Nous imageons ces souris trois fois, à trois jours d’intervalle. Le reste du protocole d’imagerie est le même que celui pour le protocole aiguë, décrit en 5.2.1.2. A chaque séance d’imagerie, on procède à 4 balayages par souris (à l’exception de la première séance de la souris #1 et la dernière de la souris #2 qui ont été écourtées pour des raisons techniques).

Cette étude préliminaire est résumée sur la **Figure 5.6**. Cette figure permet de présenter la variabilité de la mesure de CBV au cours d’une séance d’imagerie ainsi que sa variabilité d’une séance à l’autre. Ainsi, on constate qu’au sein d’une séance, on peut avoir des écarts de 10% maximum entre les différentes valeurs de CBV mesurées. Tandis que sur les 6 jours de suivi, on observe une diminution de l’ordre de 20% du CBV pour les 3 souris.



Nous avons vu, dans le cas de l’étude en aiguë des souris irradiées, que le détachement des péricytes des vaisseaux sanguins cérébraux déclenchait une augmentation de 20 à 50% de CBV environ. Ainsi, malgré cette variabilité, notre protocole expérimental sur souris mutantes devrait nous permettre de détecter des variations de CBV liées au traitement.

Par ailleurs, on a observé une perte de poids pour les trois animaux au cours de cette étude. Ainsi, en 6 jours, les souris #1 et #3 ont perdu 2% de leurs masses et la souris #2, 10%. Cet affaiblissement explique partiellement la diminution de CBV observée. Il semble être dû à un stress élevé et aux anesthésies, qui sont peut-être trop rapprochées. Dans la suite, il va donc falloir redoubler de vigilance et veiller à ce que les souris mutantes ne s’affaiblissent pas trop.

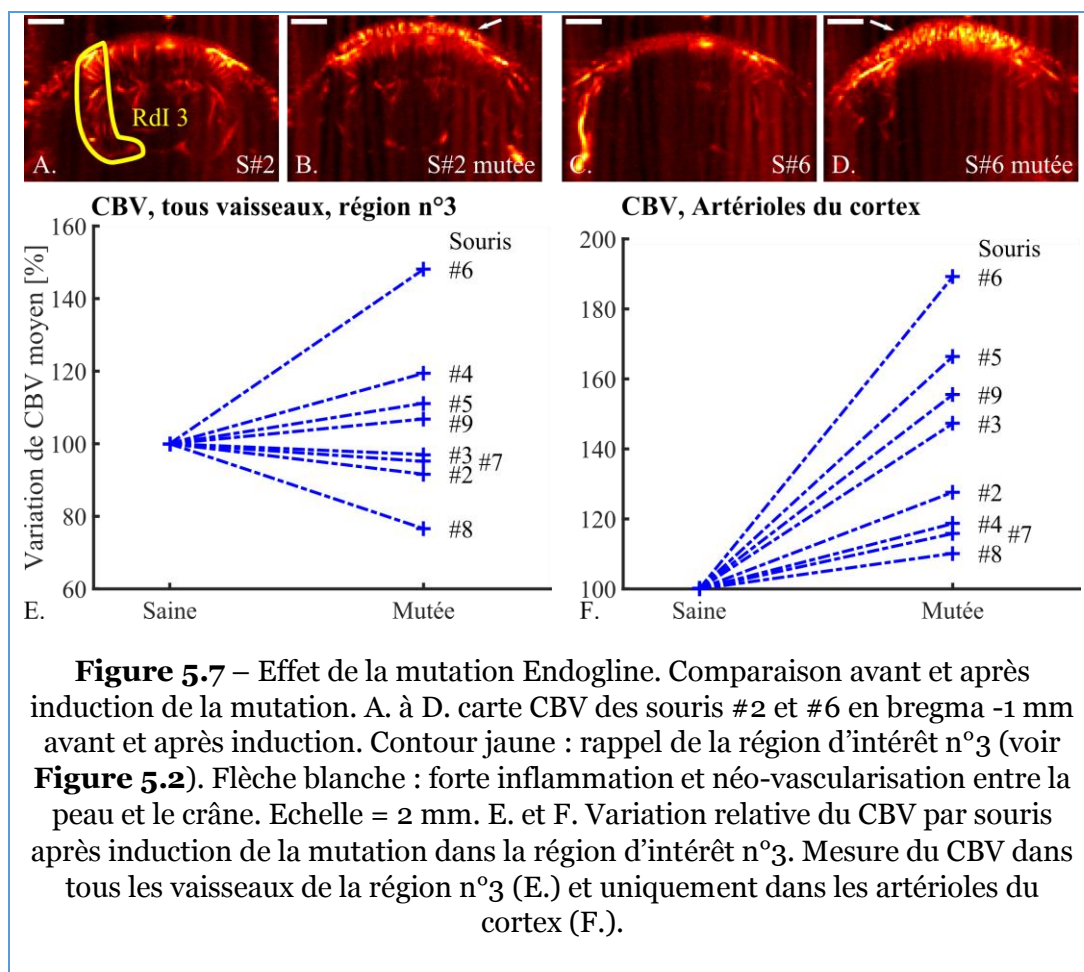
5.3.3. Souris mutantes en chronique

5.3.3.1. Effet de la mutation

Présentons maintenant les résultats de notre étude sur des souris mutantes. Pour commencer, intéressons-nous à la première partie du protocole expérimental : l’induction de la mutation. Avant induction (par injection de Tamoxifen), on peut considérer que les souris sont saines. Après induction, les péricytes de leurs cerveaux se sont normalement détachés des vaisseaux et ces derniers sont dilatés. On espère

alors observer une augmentation de l'ordre de 20 à 50% du CBV comme pour les souris irradiées.

Avant même la deuxième imagerie, on constate que la peau de toutes les souris présente de fortes inflammations aux endroits où elles sont tondues (sur le crâne pour les imageries et sur les pattes et le dos pour les différencier facilement). Cette inflammation est due à la mutation. En effet, après induction, ces souris développent une forte sensibilité aux agressions et à l'inflammation. Ainsi, cela suffit à transformer l'irritation bénigne due à la tonte en une impressionnante inflammation. De plus, cette inflammation est visible à l'imagerie. Sur toutes les souris, on constate l'apparition d'une forte néo-vascularisation entre la peau et le crâne (**Figure 5.7B et D**). On peut redouter que cette épaisseur supplémentaire gêne notre mesure, car elle sera un absorbeur supplémentaire pour les ultrasons entre la sonde et le cerveau, comme on l'expliquait en 5.3.3.1. Cela a également pour conséquence de dégrader la qualité des images et de rendre le placement et la reconnaissance des structures vasculaires délicats ; surtout dans ce cas où l'âge un peu plus élevé de ces souris, rend leurs crânes épais et donne des images difficiles à lire (Sur la souris #6 par exemple, **Figure 5.7C-D**). Aussi, l'étude des variations du CBV des souris dans la région d'intérêt n°3 (**Figure 5.7E**) ne montre pas de tendance aussi nette que pour le cas des souris irradiées. Toutefois on observe une tendance nette à la hausse du CBV si on ne regarde que le CBV artériolaire dans le cortex (**Figure 5.7F**). Dans ces figures, on ne représente pas les souris #1 et #10, décédées d'une surdose d'anesthésiant, respectivement en fin de la première séance d'imagerie et au début de la deuxième.



De même que précédemment, on réalise les mesures du flux sanguin avec nos différents estimateurs dans nos trois régions d'intérêt sur ces souris et on résume le tout dans un tableau (**Figure 5.8**). Comme on pouvait s'y attendre, les résultats sont moins nets et entachés d'une plus grande incertitude qu'en 5.3.1. Dans les cas des mesures dans les capillaires ou de l'estimation de la vitesse moyenne du sang, qui sont plus sensibles au bruit, les incertitudes de mesures sont telles qu'il n'est pas possible de conclure sur ces variations. Toutefois, dans le cas des gros vaisseaux, et surtout dans le cas des artérioles du cortex, il y a effectivement une augmentation du CBV ($p = 0,004$) et même une diminution (avec beaucoup de prudence, $p = 0,05$) de la vitesse moyenne, le tout dans des ordres de grandeur comparables à ceux obtenus pour les souris irradiées.

	CBV			Vitesse moyenne		
Cortex	V ↑ +27% ± 25	A ↑ +41% ± 28	Cap ~ +66% ± 121	V ~ -0,8% ± 3,2	A ↓ -2,2% ± 2,6	Cap ~ -0,8% ± 11
Sous-Cortical	A + V ↑ +12% ± 9,7		Cap ~ -10% ± 57	A + V ~ +0,3% ± 1,1		Cap ~ -0,9% ± 3
Cerveau	A + V ↑ +13% ± 14		Cap ~ -8% ± 64	A + V ~ +0,3% ± 1,5		Cap ~ -0,8% ± 3,1

Figure 5.8 – Tableau récapitulatif des effets de la mutation observés dans les 3 régions d'intérêt : corticale, sous-corticale et les deux en même temps, mesurés par une estimation du CBV ou de la vitesse moyenne des flux sanguins. L'estimation est faite dans les artérioles (A), les veinules (V), ou les deux (A+V), et les capillaires (Cap). Avec le pourcentage de variation et l'écart type des variations mesurées sur les 8 souris. Suivant les cas, on observe une augmentation (↑), une diminution (↓) ou pas d'effet significatif (~). Notez, comme sur la **Figure 5.5**, que la séparation entre artérioles et veinules n'est possible que dans le cortex dont on connaît l'organisation a priori (voir 3.2.5.1).

Dans ce cas, il est intéressant de constater qu'on observe principalement un effet dans les « gros » vaisseaux. Toutefois, il est possible que la mutation ait un effet sur les capillaires, mais qui ne soit pas mesurable ici. Le bruit de mesure domine alors dans nos estimations du flux capillaire. En outre, lorsqu'on mesure les flux sans séparer les vaisseaux, on somme alors ce bruit de mesure avec les effets mesurables dans les « gros » vaisseaux. Lorsqu'elle est mesurée seule, l'influence de ces « gros » vaisseaux pourrait finalement avoir été filtrée de l'influence bruitée des autres vaisseaux, et donner de meilleurs résultats.

Il est également délicat de dire pourquoi l'effet mesuré est le plus important dans les artérioles corticales. Peut-être le gène muté de nos souris affecte-t-il préférentiellement ce type de vaisseaux.

5.3.3.2. Effet des traitements

Après cette seconde imagerie, nous pouvons continuer l'étude et tâcher de voir si nous parvenons à détecter, chez ces souris, des variations de flux sanguin induites par les traitements que nous leur administrons. Rappelons que les souris sont maintenant divisées en deux groupes :

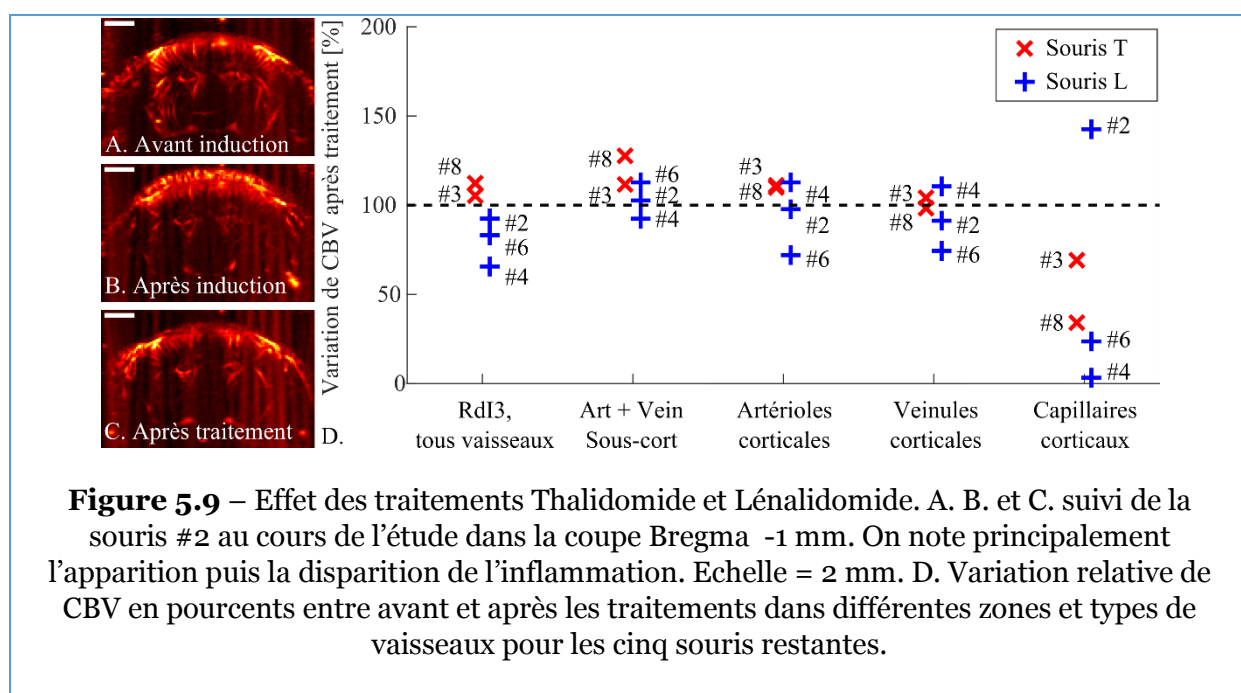
- Le groupe « T » : traité au Thalidomide. Nous voulons vérifier que ce médicament restaure la fonction péricytaire. On espère donc observer une diminution du CBV et peut-être même une augmentation de la vitesse moyenne du sang chez ces souris.

- Le groupe « L » : traité au Lénalidomide. Cette molécule a les mêmes effets que la Thalidomide mais sans action sur les péricytes. Si l'action de la Thalidomide est bien dépendante des péricytes, on observera moins de variations chez ces souris

Au cours de ces dernières phases, trois autres souris (#15, #17 et #19) décèdent. Les souris sont affaiblies et supportent moins bien l'anesthésie. On est donc obligé de réduire de 10% la dose utilisée, pour avoir un effet similaire et diminuer le risque d'une surdose létale. Sur les cinq souris restantes, on observe la disparition de l'inflammation et de la néo-vascularisation (voir **Figure 5.9A à C**). Cette disparition est provoquée par les injections de Lénalidomide et de Thalidomide. En effet, ces deux médicaments sont aussi des anti-inflammatoires.

On mesure ensuite les flux sanguins dans les trois régions d'intérêt et dans les différents types de vaisseaux. L'observation de ces mesures peine à révéler une tendance et il existe une forte variabilité d'une mesure à l'autre. Aussi, on présente sur la **Figure 5.9D**, les mesures de CBV dans tous les vaisseaux dans la région n°3, les CBV veineux et artériolaires sous-corticaux et corticaux qui sont relativement cohérents entre eux. On présente aussi la mesure dans les capillaires corticaux en guise d'illustration des autres mesures qui sont vraisemblablement trop bruitées pour être exploitables. Aucun résultat sur la vitesse moyenne des flux sanguins n'est montré pour les mêmes raisons.

Ces mesures semblent indiquer que le CBV des souris ayant été traitées au Thalidomide a continué à augmenter, tandis que celui des souris traitées au Lénalidomide a stagné voire a légèrement diminué. Ce qui est simplement l'inverse du résultat attendu. Aucune explication, à part les fortes incertitudes qui entachent nos mesures, ne peut être fournie pour le moment.



5.4. Discussion

Nous avons vu au cours de ce chapitre, comment utiliser les outils de l'imagerie fonctionnelle par ultrasons pour étudier l'impact de traitements cérébraux sur les flux sanguins de souris. Nous avons également vu comment exploiter la possibilité de séparer l'influence des flux sanguins capillaires, artériolaires ou veineux et en avons fait un potentiel outil de diagnostic neurovasculaire. Enfin, nous avons couplé la mesure du CBV à celle de la vitesse moyenne du sang dans les vaisseaux et avons montré que ces mesures peuvent être complémentaires.

Avec ces outils, nous avons pu constater qu'il est assez aisé de réaliser une étude comparative aiguë de deux groupes de souris, les unes saines, les autres irradiées et dont la fonction péricytaire est défectueuse. Dans ce cas, où les différences de CBV sont de l'ordre de 50% entre les deux groupes, nos outils se sont montrés assez performants pour mettre en évidence ces différences. Nous avons également constaté une diminution de vitesse axiale moyenne des flux sanguins concomitante à cette augmentation de CBV que nous avons expliquée avec un modèle très simple. Pour aller plus loin dans cette analyse nous pourrions ajouter de nouveaux outils de mesure vasculaire à ceux que nous avons introduits. L'imagerie en ondes planes donne par exemple accès de manière relativement simple à la pulsativité des vaisseaux sanguins. Ce qui permet, entre autres, une mesure de résistivité des vaisseaux sanguins cérébraux (Demené et al., 2014). Ajouter ces nouveaux facteurs est d'autant plus intéressant qu'ils peuvent tous être extraits de la même séquence d'imagerie, pour peu que celle-ci ait été intelligemment programmée.

La tâche s'est cependant avérée plus ardue quand il a fallu réaliser une étude chronique. Nous avons peiné à relever le défi proposé par ce suivi : être capables de mesurer de façon répétable les flux sanguins d'une dizaine de souris soumises à un traitement fatigant, trois fois à deux semaines d'intervalle. Bien que nous soyons parvenus à montrer une augmentation du CBV après l'induction de la mutation, nous avons peiné à montrer des variations significatives après le traitement de cette mutation. En outre, les variations que nous pensons observer sont contraires à celles attendues. Vu le faible nombre de souris restantes en fin de protocole, il est impossible de dire si ce que nous mesurons est dû au fait que les drogues administrées n'ont pas les effets attendus ou si nous ne sommes pas capables d'en mesurer correctement les effets. Les pistes d'amélioration de ce suivi sont nombreuses et ambitieuses.

Dans cette étude nous nous heurtons à la difficulté de mesurer le CBV toujours dans les mêmes régions cérébrales. Le placement de la souris dans le cadre stéréotaxique ainsi que la sélection manuelle des zones de mesures demeurent opérateur-dépendants. Des techniques de recalage d'image basées sur la détection de l'arbre vasculaire pourraient être mises à profit (Cohen et al., 2016). Lors de la phase de placement, elles permettraient de détecter puis corriger, via les moteurs, les écarts au placement idéal. Dans la phase de sélection des vaisseaux, elles permettraient plus de reproductibilité dans le choix des régions d'intérêt. Ce qui augmenterait la précision de la mesure de CBV.

Nous avons également constaté une forte mortalité. En plus des questions éthiques que cela soulève, la réduction du nombre de souris en fin d'expérimentation rend délicate

une analyse statistique des lots de souris. De plus, nous avons été obligés de réduire la dose d'anesthésiant administré aux souris affaiblies, pour réduire les risques de surdose létale. L'effet combiné de cet affaiblissement et de la réduction de la dose administrée sur les flux sanguins est fortement incertain et s'ajoute à un éventuel risque d'interaction médicamenteuse avec tout ce que les souris reçoivent par ailleurs. Or, un protocole d'imagerie chronique sur animaux éveillés a récemment été mis au point au laboratoire (Tiran et al., 2017). Aussi, nous proposons, de modifier le protocole en le faisant précéder d'une craniotomie pour toutes les souris, au cours de laquelle on remplacera une partie de leurs crânes par une feuille du polymère TPX et d'un implant en acier permettant un positionnement unique et répétable de la sonde échographique au-dessus de cette fenêtre. L'intérêt de cette phase peut être multiple. Le TPX étant transparent aux ultrasons, la qualité des images sera bien meilleure. De plus, il nous affranchit de tous les parasites liés au crâne comme son épaissement avec le vieillissement de la souris ou encore de l'inflammation que nous avons constaté (si la chirurgie est faite assez longtemps avant l'induction). Ce protocole permet de s'affranchir des anesthésies et donc de ses effets néfastes, et donne aussi la possibilité d'imager les souris tous les jours facilement ce qui améliorera grandement leur suivi. Enfin, l'implant en acier forçant la sonde à toujours être dans la même position pour une souris donnée, la zone imagée sera invariable. En somme, une fois au point, ce protocole d'imagerie chronique pourrait s'avérer bien plus stable et même s'appliquer à d'autres études chroniques nécessitant le suivi quotidien des animaux.

Au cours de cette étude, nous avons utilisé les outils développés pour le fUS, mais n'avons pas imagé la réponse à un stimulus. Or les péricytes jouent également un rôle dans la dilatation des vaisseaux lors du couplage neurovasculaire. Aussi, avec les outils développés au cours de ce projet, on peut envisager de compléter cette étude par une étude chronique ou aiguë des effets des drogues utilisées dans ce chapitre, sur la force ou la latence de la réponse fonctionnelle. On s'attendrait alors à une diminution du couplage neurovasculaire lorsque les péricytes sont détachés des vaisseaux sanguins.

5.5. Conclusion du chapitre

Nous avons vu dans ce chapitre comment on peut mettre à profit les outils développés pour l'imagerie fUS au cours de cette thèse afin de réaliser une étude préclinique des flux sanguins cérébraux. Nous avons montré qu'il est assez aisé de comparer en aiguë deux lots de souris. Et nous avons posé les bases d'un protocole de suivi chronique de souris au cours d'un traitement affectant leur vascularisation cérébrale.

5.6. Bibliographie

- Cohen, E., Deffieux, T., Tiran, E., Demené, C., Cohen, L., Tanter, M., 2016. Ultrasensitive Doppler based neuronavigation system for preclinical brain imaging applications, in: IEEE International Ultrasonics Symposium Proceedings. pp. 2–5.
- Demené, C., Pernot, M., Biran, V., Alison, M., Fink, M., Baud, O., Tanter, M., 2014. Ultrafast Doppler reveals the mapping of cerebral vascular resistivity in neonates. *J. Cereb. Blood*

- Flow Metab. 34, 1009–17. doi:10.1038/jcbfm.2014.49
- Hamilton, N.B., Attwell, D., Hall, C.N., 2010. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front. Neuroenergetics* 2, 1–14. doi:10.3389/fnene.2010.00005
- Lebrin, F., Srun, S., Raymond, K., Martin, S., Brink, S. Van Den, Freitas, C., Bréant, C., Mathivet, T., Larrivée, B., Thomas, J., Arthur, H.M., Westermann, C.J.J., Disch, F., Mager, J.J., Snijder, R.J., Eichmann, A., Mummery, C.L., 2010. Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nat. Med.* 16, 420–428. doi:10.1038/nm.2131
- Macé, E., Montaldo, G., Osmanski, B.-F., Cohen, I., Fink, M., Tanter, M., 2013. Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 60, 492–506. doi:10.1109/TUFFC.2013.2592
- Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P., Attwell, D., 2006. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443, 1–5. doi:10.1038/nature05193
- Rubin, J.M., Bude, R.O., Carson, P.L., Bree, R.L., Adler, R.S., 1994. Power Doppler US: a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. *Radiology* 190, 853–856. doi:10.1177/875647939601200315
- Sweeney, M.D., Ayyadurai, S., Zlokovic, B. V, 2016. Pericytes of the neurovascular unit : key functions and signaling pathways. *Nat. Neurosci.* 19, 771–783. doi:10.1038/nn.4288
- Tiran, E., Ferrier, J., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Pezet, S., Lenkei, Z., Tanter, M., 2017. Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent. *Ultrasound Med. Biol.* 1–11. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.011

6. Conclusion

Ici s'achève ce manuscrit. Au cours de ce projet, nous avons travaillé, au sein du projet HELMHOLTZ, à faire de l'imagerie fonctionnelle par ultrasons un nouvel outil pour l'ophtalmologie.

Nous avons vu que tout au long de son trajet, dans l'œil, puis le cerveau, l'information visuelle suit un chemin qui peut être imagé en détectant et en localisant des augmentations de flux sanguin dans la vascularisation cérébrale. Nous avons décrit ce phénomène de couplage neurovasculaire et avons présenté quelques-unes des techniques d'imagerie pouvant le détecter. Grâce à leur simplicité de mise en œuvre, et à leur bonne profondeur d'imagerie, les ultrasons fonctionnels représentent un choix judicieux pour cette étude préclinique. Nous avons présenté les bases de cette méthode d'imagerie et vu comment la révolution numérique, en marche depuis quelques années, et l'avènement du calcul sur cartes graphiques permettent à l'échographie de connaître un bond technologique et de rentrer dans de nouveaux domaines comme les neurosciences.

Nous avons commencé notre étude par l'imagerie de l'œil du primate non-humain et de sa rétine. Il est apparu que cet organe, fortement mobile est délicat à imager sans un lourd appareillage et une intervention que nous n'avons pas jugée nécessaire de réaliser sur ce modèle animal. De plus, la possibilité de discriminer ce mouvement parasite intervenant au moment du stimulus visuel pourra être évaluée dans le futur en utilisant une imagerie 3D temps réel. Dans ce cas, l'impossibilité actuelle de corriger un mouvement hors du plan d'imagerie sera levée et permettra une correction des mouvements globaux. Limités, pour le moment, à des acquisitions bidimensionnelles, nous avons préféré utiliser un modèle plus simple, le rat, pour lequel l'influence du mouvement était moins prégnante. Pour imager ce petit organe, nous avons dû mettre au point un dispositif d'imagerie à 30 MHz. Nous avons alors été capables de mettre en évidence une augmentation du volume sanguin dans la choroïde lorsque l'œil est stimulé par un stimulus lumineux simple émis par une diode. Cette étude préliminaire ouvre la voie de l'imagerie fonctionnelle par ultrasons à haute fréquence ce qui permettra à l'avenir d'imager avec une plus grande résolution l'œil, comme le cerveau et de localiser plus précisément des activations cérébrales plus fines. Cette étude de l'œil devra être prolongée, afin de confirmer ses résultats. Nous envisageons donc de reproduire ces expérimentations avec des inhibiteurs de la photosensibilité de la rétine ou en utilisant des stimuli localisés sur la rétine afin de déterminer s'ils provoquent

une réponse vasculaire, elle aussi, localisée. Enfin, une imagerie en trois dimensions de cet organe permettra d'obtenir une étude complète de ce dernier et de sa réponse neurovasculaire.

Nous avons poursuivi ces travaux par l'imagerie fonctionnelle du cerveau du rat anesthésié recevant des stimuli visuels. A l'aide d'un dispositif alliant la possibilité de produire des stimuli riches et variés et d'imager le cerveau en trois dimensions, nous avons reproduit plusieurs résultats connus par ailleurs avec les ultrasons fonctionnels. Ainsi, nous avons mis en évidence, en trois dimensions dans le cerveau du rat, les trois principales aires de la vision : le cortex visuel, le colliculus supérieur et les corps géniculés latéraux. Nous avons montré qu'il existe un stimulus optimal pour stimuler ces aires et que celui-ci peut varier d'une aire à l'autre. En accord avec la littérature scientifique, nous avons par exemple montré qu'un écran clignotant à la fréquence de 3 Hz stimule idéalement le cortex visuel. En utilisant ce même stimulus, nous avons montré que, dans les trois aires de la vision, la réponse CBV ne se fait pas à la même vitesse. Ainsi, le cortex visuel répond environ 0,4 s plus tard. L'étude de retards neurovasculaires de ce type pourrait montrer qu'ils sont un biomarqueur intéressant, notamment dans l'étude de maladies neurodégénératives. Nous avons montré que l'imagerie fUS est capable d'imager la spatialisation du traitement de l'information visuelle dans le cerveau. Ainsi, en utilisant deux paradigmes de stimulation différents nous avons réalisé deux cartes rétinotopiques équivalentes. Nous avons enfin montré que l'imagerie fUS pouvait permettre d'étudier l'efficacité de deux techniques de restauration visuelle. Nous avons observé des réponses CBV dans les aires visuelles de rats aveugles ayant reçu ces traitements. Tous ces résultats montrent que l'imagerie fUS peut être un outil adapté à l'étude préclinique du système visuel, de ses pathologies et de ses traitements. Par la suite, nous étudierons en chronique la vision de rats éveillés. Ceci permettra, entre autres, l'étude de la plasticité cérébrale de sujets ayant reçu une thérapie de restauration visuelle. Ces travaux sur le rat ont également été l'occasion d'augmenter la vitesse de calcul de nos séquences d'imagerie et grâce à l'adaptation de ces séquences sur un nouvel appareil, de réaliser une imagerie fUS en temps réel pouvant aller jusqu'à 500 images par seconde.

Un des objectifs principaux du projet HELMHOLTZ est aussi d'être capables de vérifier l'efficacité des techniques de restauration visuelle sur le primate. C'est pourquoi nous avons tâché de transférer les outils développés sur le rat à l'imagerie du cerveau du primate non-humain. Nous avons vu que les trois aires visuelles imagées sur le rat étaient plus profondes chez le singe et qu'il était nécessaire de changer de fréquence d'imagerie et donc de sonde pour imager les structures profondes comme les LGN. Toutefois l'imagerie à 15 MHz que nous utilisons conventionnellement est bien adaptée à l'imagerie de petites aires du cortex du primate. C'est pourquoi nous avons profité de primates ayant un implant permettant des mesures par électrophysiologie de la même taille que notre sonde et entraînés à exécuter des tâches oculomotrices. Sur ces primates, nous avons mesuré l'activité du SEF au cours de ces tâches. Nous avons vu que cette petite aire corticale surveille le bon déroulement de ces tâches. Du fait que cette aire contient une population de neurones active quand la tâche est exécutée correctement et une autre active en cas d'erreur, nous avons pu observer des baisses du niveau de CBV à chaque fois que les animaux se trompaient. Cette étude montre la faisabilité de l'imagerie fUS du primate anesthésié et éveillé, exécutant une tâche

comportementale, ainsi que la possibilité de mesurer la réponse à des événements brefs et uniques.

Nous avons terminé nos travaux par deux études précliniques réutilisant les outils mis au point au cours de cette thèse. Grâce à l'imagerie en Doppler de puissance sur laquelle repose le fUS, le but de ces études était de montrer, par le biais d'augmentations ou diminutions de CBV, l'effet de traitements ou d'une irradiation sur les péricytes : des cellules qui régulent le diamètre des capillaires cérébraux. L'étude sur l'irradiation était réalisée en aiguë, sur deux groupes de souris, les unes saines, les autres ayant subi une irradiation localisée désactivant la fonction péricytaire. Dans ce cas, nous avons montré une augmentation de l'ordre de 30% du CBV chez les souris irradiées, ainsi qu'une diminution de la vitesse axiale moyenne des écoulements sanguins que nous relierons à la dilatation des vaisseaux sanguins cérébraux suite à la perte des péricytes et donc de leur contractilité. En revanche, nos résultats furent moins nets dans l'étude chronique d'un groupe de souris mutantes. Bien que nous soyons parvenus à mesurer une augmentation de CBV chez ces souris après que la mutation ait été induite, les mesures étaient entachées d'une plus grande erreur que précédemment. Ces erreurs combinées à une forte mortalité, ont rendu difficile la dernière phase de cette étude consistant à étudier l'effet de médicaments devant secourir la fonction péricytaire. Nous pensons que l'essentiel de ces erreurs provient de l'anesthésie et du manque de reproductibilité dans le placement de notre sonde et de nos zones de mesure. C'est pourquoi, nous proposons de refaire cette étude sur des souris éveillées ayant reçu une prothèse de crâne dans un polymère transparent aux ultrasons et un implant permettant une fixation répétable et aisée de la sonde. Ces deux études nous permettent de conclure sur la faisabilité d'études précliniques utilisant les outils du fUS pour quantifier le flux sanguin et la fonction neurovasculaire. Ce qui permettra, dans la suite du projet, d'aborder plus sereinement l'étude et le suivi de modèles animaux ayant reçu des thérapies de restauration visuelle.

Enfin, au cours de tout ce projet, nous avons été amenés à développer de nombreux outils qui améliorent l'imagerie fUS, mais également l'échographie en ondes planes ultrarapide en général. Ces outils, comme l'accélération de la formation de voies ou l'imagerie à 30 MHz, seront bénéfiques pour l'ensemble de la recherche dans ces modalités d'imagerie. Ils permettent, dès aujourd'hui, à d'autres projets ambitieux de voir le jour.

Table des figures

Figure 1.1 – Le système visuel, représentation simplifiée	14
Figure 1.2 – Représentation simplifiée du fonctionnement de l'œil	15
Figure 1.3 – Exemple de rétinopathie humaine.	17
Figure 1.4 – Deux types d'implants rétiniens	18
Figure 1.5 – La perfusion cérébrale.	22
Figure 1.6 – Exemple de données IRMf	23
Figure 1.7 – Rétinopathie d'une souris par imagerie optique intrinsèque	24
Figure 1.8 – Exemple d'image échographique.....	26
Figure 1.9 – Principe de formation d'une image échographique	27
Figure 1.10 – Illustration des deux techniques de Doppler conventionnelles	29
Figure 1.11 – Principe de l'imagerie en ondes planes.....	30
Figure 1.12 – Principe de l'imagerie Doppler	32
Figure 1.13 – Exemple d'imagerie fUS	34
Figure 2.1 – Dispositif d'imagerie fonctionnelle par ultrasons de l'œil	43
Figure 2.2 – Imagerie de l'œil d'un macaque	44
Figure 2.3 – Artéfact de mouvement sur la carte de corrélation (cas extrême).....	45
Figure 2.4 – Entrelacement, schéma de principe.....	47
Figure 2.5 – Imagerie en Doppler de puissance de l'œil de rat	49
Figure 2.6 – Imagerie fUS de l'œil de rat	49
Figure 3.1 – Dispositif expérimental	57
Figure 3.2 – Résultat d'une session d'imagerie de 330 s.....	59
Figure 3.3 – Evolution de la réponse CBV en fonction des paramètres de clignotement.....	61
Figure 3.4 – Répétabilité de l'optimisation de la fréquence de clignotement	62
Figure 3.5 – Imagerie fUS en 3D	63
Figure 3.6 – Mesure de délais de réponse CBV dans les aires visuelles	65
Figure 3.7 – Imagerie fUS de la latéralisation de l'information visuelle	66
Figure 3.8 – Rétinopathie d'un rat par stimuli épisodiques.....	67
Figure 3.9 – Stimulus visuel continu et périodique.	69
Figure 3.10 – Délais d'activation dans le cerveau	70
Figure 3.11 – Réalisation d'une rétinopathie « rapide »	71
Figure 3.12 – Analyse spectrale des flux cérébraux	73
Figure 3.13 – Avance de la réponse CBV par rapport à la réponse des vaisseaux « intermédiaires descendants ».....	75

Figure 3.14 – Imageries fUS d’un rat portant un implant rétinien.....	77
Figure 3.15 – Imagerie fUS d’un rat aveugle dont l’œil droit a été rendu photosensible par optogénétique.....	78
Figure 3.16 – Gestion des données schématisée	80
Figure 4.1 – Positionnement de la sonde échographique et du plan d’imagerie pour l’imagerie du cortex visuel du macaque.....	90
Figure 4.2 – Imagerie fUS du cortex visuel d’un Macaque.....	91
Figure 4.3 – Imageries en Doppler de puissance de la vascularisation cérébrale du macaque.....	93
Figure 4.4 – Présentation du SEF	94
Figure 4.5 – Imagerie du SEF, dispositif expérimental	95
Figure 4.6 – Imagerie fUS de la tâche de pro-saccade dans le SEF.....	97
Figure 4.7 – Variation du CBV dans le SEF pendant une unique succession de tâches oculomotrices et localisation de chaque essai.	99
Figure 5.1 – Schéma simplifié des diverses structures intervenant dans le couplage neurovasculaire.....	103
Figure 5.2 – Zones d’imagerie.....	108
Figure 5.3 – Augmentation du CBV après irradiation	109
Figure 5.4 – Exemple de différentes mesures sur les flux sanguins	110
Figure 5.5 – Tableau récapitulatif des effets de l’irradiation.	112
Figure 5.6 – Imageries de trois souris saines à trois jours d’intervalle	113
Figure 5.7 – Effet de la mutation Endogline.....	115
Figure 5.8 – Tableau récapitulatif des effets de la mutation.....	116
Figure 5.9 – Effet des traitements Thalidomide et Lénalidomide	117

Définitions, abréviations et anglicismes fréquemment utilisés

Aiguë/chronique	Termes médicaux d'expérimentation animale. Une imagerie est faite « en aiguë » lorsque chaque animal n'est imagé qu'une fois. Une expérimentation chronique consiste à imager plusieurs fois chaque animal au cours du temps.
Beamforming	Formation de voies (ou formation de faisceaux)
BOLD	<i>Blood Oxygen Level Dependent</i> – Signal mesuré en IRMf
CBV	<i>Cerebral Blood Volume</i> – Volume de sang et nombre d'hématies dans un pixel
CCA	Cortex Cingulaire Antérieur
fUS	<i>Functional Ultrasound</i> – Imagerie fonctionnelle par ultrasons
fMRI – IRMf	Imagerie fonctionnelle par résonance magnétique
GPU	<i>Graphique Processing Unit</i> – une puissante carte graphique
Interleaving	Entrelacement : une technique d'échantillonnage
LDF	<i>Laser Doppler Flowmetry</i> – Mesure des flux sanguins par effet Doppler laser
LGN	<i>Lateral Geniculate Nucleus</i> – Corps Géniculé Latéral
PRF	<i>Pulse Repetition Frequency</i> – fréquence entre deux évènements d'émission/réception
SC	<i>Superior Colliculus</i> – Colliculus supérieur
SEF	<i>Supplementary Eye Field</i>
TPX	Polymère : Polyméthylpentène, transparent aux ultrasons
V1/V2	Cortex visuel (aires principalement développées chez le rat)

Publications et congrès

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

Gesnik, M., Blaize, K., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Sahel, J.-A., Fink, M., Picaud, S., Tanter, M., 2017. 3D functional ultrasound imaging of cerebral visual system in rodents. *NeuroImage*

Publications dans des revues de proceedings sans comité de lecture

Gesnik, M., Blaize, K., Dizeux, A., Sahel, J.-A., Fink, M., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Picaud, S., Tanter, M., Spatiotemporal response of rat visual cortex during moving stimuli using Functional Ultrasound (fUS) imaging. *Ultrasonics Symposium (IUS), 2016 IEEE International*

Demené, C., Bimbard, C., **Gesnik, M.**, Radtke-Schuller, S., Shamma, S., Boubenec, Y., Tanter, M., Functional Ultrasound Imaging of the thalamo-cortical auditory tract in awake ferrets using ultrafast Doppler imaging. *Ultrasonics Symposium (IUS), 2016 IEEE International*

Présentations orales en conférences internationales

Gesnik, M.*, Blaize, K., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Sahel, J.-A., Fink, M., Picaud, S., Tanter, M. 3D functional ultrasound imaging of the rat visual pathway. *World Molecular Imaging Congress*. Philadelphie, USA, 2017

Demené, C.*, Bimbard, C., **Gesnik, M.**, Shamma, S., Boubenec, Y., Tanter, M., Brain functional ultrasound imaging and high resolution mapping of the tonotopic organization of the thalamo-cortical auditory tract in awake ferrets. *World Molecular Imaging Congress*. Philadelphie, USA, 2017 (Poster)

Dizeux, A.*, **Gesnik, M.**, Wattiez, N., Deffieux, T., Pouget, P., Tanter, M., Network Dynamic for Control and Monitoring of Movement Revealed by NeuroFunctional

Ultrasound Imaging In Awake Behaving Non-Human Primates. *World Molecular Imaging Congress*. Philadelphie, USA, 2017 (Poster)

Gesnik, M.*, Blaize, K., J.-L., Sahel, J.-A., Fink, Deffieux, T., Gennisson, M., Picaud, S., Tanter, M., Functional Ultrasound (fUS) allows measurements of Cerebral Blood Volume response delays. *IEEE International Ultrasonics Symposium*. Washington D.C., USA, 2017

Dizeux, A., **Gesnik, M.***, Wattiez, N., Deffieux, T., Pouget, P., Tanter, M., Functional Ultrasound Imaging in Awake Non-Human Primates Performing Voluntary Saccad. *IEEE International Ultrasonics Symposium*. Washington D.C., USA, 2017

Gesnik, M.*, Blaize, K., Dizeux, A., Sahel, J.-A., Fink, M., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Picaud, S., Tanter, M., Spatiotemporal response of rat visual cortex during moving stimuli using Functional Ultrasound (fUS) Imaging. *European Society for molecular imaging – Winter Conference*. Les Houches, France, 2017 (Poster)

Blaize, K.*, **Gesnik, M.**, Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Sahel, J.-A., Fink, M., Tanter, M., Picaud, S., 3D Functional ultrasound imaging maps the visual system in rodents with high spatial and temporal precisions. *ARVO Annual meeting*. Baltimore, USA, 2017

Gesnik, M.*, Blaize, K., Dizeux, A., Sahel, J.-A., Fink, M., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Picaud, S., Tanter, M., Spatiotemporal response of rat visual cortex during moving stimuli using Functional Ultrasound (fUS) imaging. *IEEE International Ultrasonics Symposium*. Tours., France, 2016

Demené, C.*, Bimbard, C., **Gesnik, M.**, Radtke-Schuller, S., Shamma, S., Boubenec, Y., Tanter, M., Functional Ultrasound Imaging of the thalamo-cortical auditory tract in awake ferrets using ultrafast Doppler imaging. *IEEE International Ultrasonics Symposium*. Tours., France, 2016

Gesnik, M.*, Zamfirov, L., Prevot, P.-H., Duhamel, L., Picaud, S., Sahel, J.-A., Fink, M., Deffieux, T., Gennisson, J.-L., Tanter, M., Investigating functional ultrasound imaging for in vivo dissection of the visual pathway using light stimulations. *IEEE International Ultrasonics Symposium*. Taipei, Taïwan, 2015

* indique l'orateur

Résumé

Ces travaux de thèse portent sur les récents progrès de l'imagerie fonctionnelle par ultrasons et ses nouvelles applications en ophtalmologie. Dans le cadre d'un projet mêlant physique des ondes, imagerie, neurosciences et ophtalmologie, nous avons appliqué cette technologie à l'imagerie du système visuel et à l'étude préclinique de thérapies le ciblant. Au cours de ce projet, nous avons accompagné nos études précliniques de progrès constants dans notre imagerie.

Un dispositif permettant l'imagerie du cerveau en 3 dimensions a été conçu. Cette imagerie a été réalisée en temps réel, ou à une fréquence ultrasonore de 30 MHz grâce au procédé d'entrelacement. Grâce à une connaissance a priori de l'architecture vasculaire cérébrale et à l'effet Doppler, il est possible de réaliser une décomposition spectrale des écoulements sanguins cérébraux selon leurs vitesses et de leurs orientations.

Ceci a permis une étude des fonctions visuelles du rat et du primate non-humain. Nous avons imagé la rétine du primate en Doppler de puissance, mais sa forte mobilité en fait un organe délicat à imager en imagerie fonctionnelle. En revanche, nous avons réalisé une imagerie fonctionnelle de la rétine de rat à 30 MHz. Nous avons caractérisé en détail le système visuel cérébral de ce rongeur. Nous avons mis en évidence ses principales structures et redémontré leurs caractéristiques les plus connues, comme leur organisation rétinotopique ou leur différence de temps de réponse neurovasculaire à un stimulus. Des animaux traités par des thérapies de restauration visuelle a été imagée. La première imagerie de primates non-humains anesthésiés puis éveillés et exécutant une tâche comportementale, et la détection de variations de flux sanguins dues à des erreurs uniques ont été réalisées. Enfin, une étude préclinique aiguë et une étude chronique de traitements ayant des effets neurovasculaires ont été menées grâce au suivi du flux sanguin par nos procédés.

Mots Clés

Imagerie Fonctionnelle par Ultrasons
Neurosciences
Vision

Abstract

This thesis focuses on recent improvements in the functional ultrasound imaging (fUS) technique and their applications in the field of ophthalmology. Within the framework of a synergetic project blending waves physics, medical imaging, neuroscience and ophthalmology, fUS was shown to be capable of imaging and studying the visual system of healthy and diseased animals for the purpose of preclinical studies. To tackle these issues, constant upgrades in the fUS technique had to support the preclinical studies.

An experimental set-up was built to image the visual pathway in three dimensions with fUS. Using a new imaging facility, fUS was proven to be feasible in real time and at high ultrasound frequencies such as 30 MHz. Interleaved sampling had to be implemented in that case. Furthermore, the *a priori* knowledge of the vascular cerebral architecture and the Doppler Effect were exploited to spectrally decompose cerebral blood flux and vessels according to their velocities and orientations.

Leveraging these improvements, functional ultrasound imaging of rats and non-human primates was performed. Primate retina was imaged with Power Doppler, but proved to be too mobile to be functionally imaged. However, fUS has been performed on rat retina after 30 MHz fUS imaging had been implemented. The rat visual pathway has then been characterised with fUS. Some of its known features were highlighted such as its retinotopic organisation or the time response differences between some of its structures. The same set-up has been leveraged to map the cerebral activity of animal that underwent visual restoration therapies. These tools were then used to map cerebral activity in anesthetized and awake and behaving monkeys. Unique blood volume variations due to unique mistakes were detected. These tools were finally applied to two preclinical trials on a depressive state of the brain vascular contractility. Blood volume and blood velocity changes were highlighted throughout an acute and a chronic study.

Keywords

Functional Ultrasound Imaging
Neuroscience
Vision