



HAL
open science

Instrumentation et méthodologies pour les études cérébrales in vivo sur modèles animaux : mesure cinétiques de radiotraceurs et imageries optiques en champ large.

Frederic Pain

► To cite this version:

Frederic Pain. Instrumentation et méthodologies pour les études cérébrales in vivo sur modèles animaux : mesure cinétiques de radiotraceurs et imageries optiques en champ large.. Optique / photonique. Université Paris Sud, 2012. tel-01316112

HAL Id: tel-01316112

<https://hal.science/tel-01316112>

Submitted on 28 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



Habilitation à Diriger des Recherches

Instrumentation et méthodologies pour les études cérébrales in vivo sur modèles animaux : mesure cinétiques de radiotraceurs et imageries optiques en champ large.

Soutenue le 21 Septembre 2012 à Orsay

Frédéric Pain

Laboratoire Imagerie et Modélisation en Neurobiologie et Cancérologie
UMR 8165 Université Paris Sud / CNRS

Présidente

Nathalie Westbrook Laboratoire Charles Fabry, IOGS CNRS UMR8502 Université Paris Sud

Rapporteurs

Laurent Bourdieu Institut de Biologie de l'ENS, Paris CNRS UMR 8197 INSERM U1024

Alain Plénevaux Centre de Recherches du Cyclotron, Université de Liège

Mickaël Tanter Institut Langevin, Paris CNRS UMR 7587 INSERM U979 ESPCI ParisTech

Examineur

Philippe Lanièce Laboratoire Imagerie et Modélisation en Neurobiologie et Cancérologie CNRS
UMR8165 Université Paris Sud

Sommaire

SOMMAIRE	2
LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES ABREVIATIONS	6
PARTIE I LA SONDE INTRACEREBRALE SIC	10
1 DEVELOPPEMENT DU DETECTEUR	12
1.1 PRINCIPE DE LA SONDE.....	12
1.2 EVALUATION DES PARAMETRES PHYSIQUES PAR SIMULATIONS MONTE CARLO.....	13
1.3 BRUIT DE FOND γ GENERE PAR L'ANNIHILATION DES POSITRONS.....	14
1.4 DEFIS TECHNOLOGIQUES POUR LA CONSTRUCTION DE LA SONDE INTRACEREBRALE.....	17
1.5 DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES ULTERIEURS.....	22
2 ETUDES IN VIVO CHEZ LE RONGEUR ANESTHESIE AVEC LA SONDE INTRACEREBRALE RADIOSENSIBLE	28
2.1 PHARMACOCINETIQUE.....	29
2.2 ETUDE DU METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL.....	32
2.3 METHODOLOGIE POUR LA MESURE DE LA FONCTION D'ENTREE ARTERIELLE.....	35
3 VALORISATION	37
4 PRODUCTION SCIENTIFIQUE	37
5 ACTIVITE D'ENCADREMENTS	40
6 CONCLUSION PERSONNELLE DE CETTE ETAPE : CONDITIONS DU SUCCES DES TRAVAUX INSTRUMENTAUX A L'INTERFACE PHYSIQUE BIOLOGIE	41
PARTIE II IMAGERIE OPTIQUE IN VIVO EN CHAMP LARGE	44
1 CONTEXTE DES DEVELOPPEMENTS EN IMAGERIE OPTIQUE IN VIVO	45
1.1 QUESTIONS AUTOUR DU METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL.....	45
1.2 QUEL MODELE DE L'ACTIVATION CEREBRALE ?.....	48

<u>2 IMAGERIE OPTIQUES EN CHAMP LARGE : IMAGERIE DE REFLECTANCE ET IMAGERIE DE L'AUTOFLUORESCENCE</u>	<u>51</u>
2.1 PRINCIPE DE L'IMAGERIE OPTIQUE DU SIGNAL INTRINSEQUE	52
2.2 PRINCIPE DE L'IMAGERIE D'AUTOFLUORESCENCE.	54
2.3 DISPOSITIFS D'ENREGISTREMENTS CONSTRUITS AU LABORATOIRE	55
2.4 METHODOLOGIE POUR L'ANALYSE DES SIGNAUX D'AF.....	59
2.5 ENREGISTREMENTS IN VIVO AVEC LE DISPOSITIF	61
<u>3 IMAGERIE MULTISPECTRALE DU SIGNAL INTRINSEQUE.....</u>	<u>65</u>
3.1PRINCIPE	65
3.2 ETAT DE L'ART DES ETUDES MULTISPECTRALES CHEZ LE PETIT ANIMAL.....	67
3.3 ARCHITECTURE DU DISPOSITIF POUR L'IMAGERIE MULTISPECTRALE.....	68
3.4 EVALUATION DU « DIFFERENTIAL PATHLENGHT » (DP).....	71
3.5 OPTIMISATION DU CHOIX DES LONGUEURS D'ONDE	75
3.6 PREMIERS RESULTATS IN VIVO ETNOUVELLES QUESTIONS.....	78
<u>4 PRODUCTION SCIENTIFIQUE</u>	<u>81</u>
<u>5 ACTIVITES D'ENCADREMENTS ET D'ENSEIGNEMENT SUR LA THEMATIQUE DE L'IMAGERIE OPTIQUE IN VIVO.....</u>	<u>82</u>
<u>6 CONCLUSION PERSONNELLE DE CETTE ETAPE.</u>	<u>85</u>
<u>PARTIE III PROJETS EN COURS ET FUTURS.....</u>	<u>87</u>
<u>1 IMAGERIE MULTIMODALE EN CHAMP LARGE</u>	<u>87</u>
<u>2 IILUMINATION STRUCTUREE EN CHAMP LARGE.....</u>	<u>89</u>
<u>3 MESURES DES PROPRIETES OPTIQUES DES TISSUS - SIMULATION MONTE CARLO DES PHOTONS SOUS GATE.</u>	<u>92</u>
<u>4. MICROSCOPIE NON LINEAIRE IN VIVO.....</u>	<u>94</u>
4.1 MICROSCOPIE OPTIQUE NON LINEAIRE DES TISSUS PROFONDS.....	95
4.2 ENDOMICROSCOPIE POUR LA BIOPSIE OPTIQUE	96
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	<u>99</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	<u>101</u>

Liste des figures.

Figure 1. Simulations Monte Carlo des positrons du ^{18}F pour l'étude des paramètres physiques de la sonde.	13
Figure 2. Différentes situations expérimentales associant différentes géométries de sonde, différents traceurs et différentes structures cérébrales.	14
Figure 3. Géométrie considérée pour le calcul analytique du rapport entre le signal β et le bruit γ	15
Figure 4 . Construction du fantôme voxelisé corps entier à partir d'une image IRM haute résolution	16
Figure 5. Architecture générale de détection pour la sonde SIC	18
Figure 6. Chaîne de photo-détection de la sonde SIC.....	20
Figure 7. Modélisation simplifiée pour la quantification de la fixation du ^{18}F -MPPF dans le noyau du raphé dorsal (DRN).....	23
Figure 8. Principe de la simulation pour la quantification absolue de la sonde SIC.	24
Figure 9. Optimisation des coordonnées stéréotaxiques.....	24
Figure 10. Couplage de la sonde SIC et de la microdialyse.....	26
Figure 11. Influence d'un champ magnétique sur le volume de détection de la sonde intracérébrale.....	27
Figure 12 Association SIC – IRM.	28
Figure 13. Pharmacocinétique du ^{11}C -raclopride mesurée par la sonde SIC.	30
Figure 14. Validation des études de fixation compétitive pour le ^{18}F -MPPF dans le noyau raphé dorsal (NRD).	32
Figure 15. Etude du métabolisme du glucose sur un modèle de lésion métabolique	34
Figure 16. Protocole double injection pour l'étude du métabolisme lors d'une activation sensorielle.	35
Figure 17. Mesure de la fonction d'entrée artérielle avec la sonde SIC.	36
Figure 18. Cadre de travail des activités en imagerie optique pour l'étude du métabolisme énergétique.....	47
Figure 19. Organisation de la muqueuse et du bulbe olfactif.....	49
Figure 20. Organisation cellulaire dans le bulbe olfactif.....	50
Figure 21. Principales modalités pour les études de l'activation fonctionnelle cérébrale in vivo.....	52
Figure 22 Source du signal en Imagerie Optique du Signal Intrinsèque.....	53
Figure 23 Propriétés optiques des tissus et implication en IOSI.	54
Figure 24. Dispositif expérimental pour les enregistrements in vivo en IOSI et AF.	57
Figure 25. Performances globales du dispositif d'imagerie pour l'IOSI et l'AF.	58
Figure 26. Modèles anatomo-optiques du cortex somato-sensoriel (C _{ss}) et du bulbe olfactif (BO).....	60
Figure 27. Simulations des signaux d'AF pour l'activation une colonne corticale ou d'un glomérule.....	60
Figure 28. Carte des variations du signal intrinsèque pour les souris C57BL6 et les souris Cx30-KO pour des stimulations d'intensité croissante.	62

Figure 29 Caractéristiques des signaux d'AF dans le BO.....	64
Figure 30. Données obtenues en imagerie multispectrales lors de l'activation du cortex somatosensoriel chez le rat.....	68
Figure 31 : Diagramme des signaux temporels du système multispectral	70
Figure 32. Estimation du DP pour des modèles monocouches et multicouches du C _{ss} et du BO	72
Figure 33. Influence des variations locales et globales des paramètres optiques sur les valeurs du DP.....	73
Figure 34. Influence d'une fine couche d'os sur le DP.....	73
Figure 35. Influence du DP pour l'estimation des signaux hémodynamiques.....	74
Figure 36 : Coefficients de diaphonie pour différents couples de longueurs d'onde sur la gamme 440-640nm.....	76
Figure 37. Cartographie des variations hémodynamiques au maximum d'activation déterminées à partir des variations de réflectance à trois longueurs d'onde.	77
Figure 38. Influence du choix des longueurs d'onde sur la détermination des variations hémodynamiques.....	77
Figure 39 : Cartographies pour différentes longueurs d'onde des variations de réflectance prises au temps correspondant au maximum des signaux.	78
Figure 40 Décours temporel des signaux de réflectances observés à trois longueurs d'onde et signaux hémodynamiques associés.	78
Figure 41 : Comparaison des signaux de réflectance multispectrale (A) et des variations relatives de flux (B) obtenus simultanément lors d'une stimulation unique.	89
Figure 42 : Architecture du dispositif en illumination structurée.....	91
Figure 43. Propriétés optiques des tissus frais de rat.	94
Figure 44 Architecture du microendoscope multimodal.....	99

Liste des abréviations

2DG 2-Deoxyglucose
5-ALA acide 5-Aminolévulinique
5HT_{1A} 5- Hydroxytryptamine 1A
AF Autofluorescence
BO Bulbe Olfactif
BOLD Blood Oxygen Level Dependant
CBF Cerebral Blood Flow
CBV Cerebral Blood Volume
CCD Charge Coupled Device
cMRO₂ cerebral Metabolic Rate of O₂
cMRgl cerebral Metabolic Rate of glucose
Css Cortex Somatosensoriel
CT Computed Tomography
Cx30-KO Connexine 30 KO
DMD Digital Micro Mirror
DP Differential Pathlength (chemin différentiel)
EPL External Plexiform Layer (Couche plexiforme externe)
FDG Fluorodeoxyglucose
GL Glomerular Layer (Couche glomerulaire)
GRIN Gradient Index (lens)
ICLS Imagerie du Contraste Laser Speckle
IOSI Imagerie Optique du Signal Intrinsèque
IRM Imagerie par résonance magnétique
IRMf Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
ICMRgl local Metabolic Rate of Glucose
LCTF Liqui Cristal Tunable Filter
MC Monte Carlo

MCL Mitral Cell Layer (Couche des cellules mitrales)
MCNP Monte Carlo N Particles
MPPF 2'-methoxyphenyl-(N-2'-pyridinyl)-p-fluoro-benzamidoethyipiperazine
NADH Nicotinamide adénine dinucléotide
NDR Noyau Dorsal du Raphé
FAD Flavine adénine dinucléotide
NIRS Near Infra Red Spectroscopy
ONL Olfactory Nerve Layer (Couche du nerf olfactif)
PpIX Protoporphyrin IX
PMT Photomultiplicateur
SIC Sonde IntraCérébrale
SLM Spatial Light Modulator
SRMN Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire
TEP Tomographie par émission de positron
TOL Tractus Olfactif Latéral

Quelles approches pour le développements d'instruments pour l'étude in vivo des mécanismes cérébraux sur les modèles animaux ?

Au moment d'écrire cette habilitation à diriger les recherches, je me suis interrogé sur les contours à donner à un tel document tant sur la forme que sur le fond. Une grande liberté étant laissée sur ces deux aspects à l'Université Paris Sud qui accueille mes activités d'enseignant chercheur, je présenterai brièvement la philosophie qui m'a accompagné lors de la rédaction de ce document et la portée que je souhaite lui donner. Après environ dix années de recherches en instrumentation à l'interface physique biologie et plus précisément à l'interface avec les neurosciences, je pense avoir acquis une certaine expérience dans la manière de mener ces recherches et d'y faire fructifier efficacement les interactions entre les différents acteurs physiciens et biologistes. L'un des objectifs de cette HDR sera de présenter un bilan des principaux résultats scientifiques obtenus, mais également de porter cette vision des recherches à l'interface physique neuroscience en tant qu'association fructueuse et quotidienne entre chercheurs depuis la conception des projets jusqu'à la discussion des résultats. Ces aspects ainsi que le rôle essentiel des étudiants (doctorants et stagiaires) et ma conception de leur encadrement dans une équipe de recherche seront abordés en conclusion de chacune des parties décrivant mes travaux. Le document suit dans ses grandes lignes la chronologie de mon parcours mais j'ai parfois volontairement fait des entorses à cette règle tacite lorsque cela me semblait nécessaire pour exposer la cohérence globale de mes travaux. J'essaierai de montrer dans ce document comment le va et vient entre les travaux instrumentaux et leurs applications sur des problématiques biologiques se nourrissent mutuellement. Dans une première partie j'exposerai les développements méthodologiques pour les mesures in vivo des cinétiques de molécules radio-marquées chez le rongeur que j'ai mené pendant ma thèse et les cinq années qui ont suivies. Je présenterai successivement les deux aspects de mes travaux à savoir les développements instrumentaux et méthodologiques et leurs applications en neurosciences. Dans une seconde partie, je présenterai mes travaux en imagerie optique multimodale en champ large, pour l'étude des mécanismes du métabolisme énergétique cérébral. Enfin, dans une troisième partie, je présenterai les travaux en cours ou que je souhaite développer à court terme

en imagerie optique du petit animal, ainsi que ceux qui débudent actuellement pour le développement d'un endomicroscope non linéaire pour les applications cliniques en neuro-oncologie.

Partie I La sonde intracérébrale SIC

Au milieu des années 90, de nombreuses modalités d'imagerie (Imagerie par résonance magnétique nucléaire, radio-imagerie γ , imagerie X, ou imagerie ultrasonores) ont été adaptées aux études sur les rongeurs, principalement rats et souris. Ces développements répondaient au besoin d'outils pour l'imagerie in vivo des modèles animaux dont les progrès en génie génétique ont augmenté la disponibilité ainsi que la complexité. Ces modèles, notamment murins, sont devenus les acteurs incontournables de la recherche tant fondamentale qu'appliquée en biologie et médecine. Un mouvement global de translation des études in vitro vers les études in vivo a été motivé tant par une plus grande réalité biologique et la nécessité de suivre des paramètres dynamiques sur des durées allant jusqu'à plusieurs mois, que par des considérations éthiques et pratiques, notamment en diminuant le nombre d'animaux impliqués. Ce nouveau domaine a émergé sous le nom d'imagerie du petit animal, un domaine actuellement mature du point de vue des méthodologies et instruments dédiés souvent regroupés en plateformes (pour un état de l'art du domaine on se référera à l'ouvrage récent « Small Animal Imaging » (Kieβling 2011)). Parmi les nombreux outils d'investigation disponibles pour les études en neuroscience, les techniques de radio-imagerie occupent une place importante en raison de leur excellente sensibilité et de leur capacité à produire des données quantitatives. La technique standard couramment pratiquée au milieu des années 90 était l'autoradiographie, qui est une imagerie ex vivo réalisée par dépôt d'une fine coupe de tissus radio-marqués sur une émulsion photographique suivi de la révélation du film. Cette technique, malgré une résolution spatiale élevée, l'obtention de la bio-distribution et d'une quantifications absolue de la concentration du radio-traceur était cependant mal adaptée aux études cinétiques de la fixation au cours du temps. En effet, l'obtention d'une cinétique complète nécessite le sacrifice de nombreux animaux, est donc très lourde de mise en œuvre et souffre de la variabilité interindividuelle entre les différents animaux utilisés pour l'étude. Les années 90 ont alors vu le développement de imageurs microIRM, microTEP (Lecomte et al. 1996; Cherry et al. 1997) puis microCT (Paulus et al. 2000) dédiés aux études précliniques sur petits animaux respectivement par imagerie IRM, tomographie par émission de positrons ou tomographie X, permettant d'obtenir des données tant anatomiques que fonctionnelles. L'un des enjeux majeurs du développement de l'imagerie in vivo est d'obtenir des données cinétiques in vivo sur un même animal, soit pour obtenir la

cinétique d'un traceur sur une période de quelques minutes à quelques heures soit pour des études au cours du temps (« longitudinales »). Dans ce cas les signaux sont enregistrés répétitivement sur le même animal à intervalles de plusieurs jours, semaines ou mois pour étudier l'évolution d'un paramètre physiologique en conditions normales ou pathologiques. Ces études précliniques sont indispensables à la mise en place de nouveaux traitements. Cependant, les radio-tomographes développés au début des années 90 souffraient de trois inconvénients : l'impossibilité de réaliser des expériences chez l'animal éveillé et libre de ses mouvements, un coût élevé et la difficulté de mise en œuvre de leur couplage avec d'autres techniques. Malgré les progrès en résolution spatiale puis en sensibilité des radio-tomographes, au cours de la dernière décennie, ces limitations demeurent encore aujourd'hui. Afin de répondre à ces contraintes, le groupe Interface Physique Biologie de l'Institut de Physique Nucléaire d'Orsay contacté par les neurobiologistes du centre d'étude et de recherche médicale par émission de positron (CERMEP, Lyon) a proposé dès 1996, la réalisation du détecteur SIC (pour Sonde IntraCérébrale), une sonde radiosensible β implantable dans les tissus cérébraux, destinée à mesurer la concentration locale de radioactivité. Ce projet que j'ai conduit durant ma thèse puis durant mes premières années de recherche a permis de répondre au besoin d'un instrument aisé de mise en œuvre et rapidement intégrable dans les laboratoires de Neurosciences et les centres d'imagerie TEP.

Dans cette première partie, je ferai un rapide bilan de mes activités de recherche autour du développement et de la mise en œuvre in vivo de la sonde intracérébrale SIC. Afin d'éviter un catalogue de publications, je balaierai rapidement le principe et la construction du détecteur puis je résumerai les différents domaines d'application pour lesquels le détecteur a prouvé son intérêt. Je présenterai en détail les expériences réalisées pour l'étude du métabolisme énergétique cérébral puisqu'elles ont constitué un tournant essentiel pour mes travaux ultérieurs en imagerie optique. Je conclurai cette partie en proposant un bilan de ces travaux du point de vue de l'apprentissage du travail à l'interface physique biologie.

1 Développement du détecteur

1.1 Principe de la sonde

La sonde SIC est un compteur miniature de radioactivité β destiné à être implanté dans les tissus par chirurgie stéréotaxique chez l'animal anesthésié, c'est à dire dans un repère fixé vis à vis de repères anatomiques sur le crâne de l'animal. L'implantation est réalisée avec une précision d'environ 100 micromètres dans les trois directions et constitue un geste technique standard pour les neurobiologistes car mis en œuvre depuis des décennies pour les techniques impliquant l'insertion d'électrodes comme la voltamétrie, la microdialyse, l'électrophysiologie. Le principe de SIC repose sur le fait que, dans les tissus biologiques, les particules β parcourent une faible distance (quelques mm) avant arrêt. Ainsi, si l'on implante chirurgicalement un capteur dont seule l'extrémité est radiosensible au sein d'un tissu, ce faible parcours délimite un petit volume autour du détecteur, à l'intérieur duquel toute particule peut interagir avec la sonde. Prenons par exemple, le cas du ^{18}F , l'un des isotopes émetteur de particules β^+ le plus couramment utilisé en imagerie TEP. La distribution en énergie des positons qu'il émet ($\langle E \rangle = 249,3\text{keV}$ et $E_{\text{max}} = 633,5\text{keV}$) induit un parcours n'excédant pas 2,3mm dans les tissus biologiques, comme illustrée sur la figure 1. Autrement dit, toute particule β émise à une distance supérieure à 2,3 mm de la sonde sera arrêtée dans les tissus et ne sera en conséquence jamais détectée. En fait cette distance est en moyenne nettement plus faible du fait des trajectoires erratiques des β . Avant d'aborder la configuration du détecteur, nous allons présenter dans cette première partie les aspects théoriques relatifs aux contraintes de détection rencontrées dans notre projet. L'une de contraintes particulières de SIC réside dans la conception d'un détecteur β^+ implantable dans les tissus donc impérativement de très petites dimensions (diamètre inférieur à 1 mm, adapté à la faible accessibilité du système nerveux central de rongeur et à la petite taille des noyaux cérébraux le constituant) mais suffisamment sensible pour quantifier la concentration d'un radiotracer dans un groupe de neurones spécifiques. Deux paramètres conditionnent le succès d'une telle mesure : un aspect biochimique relatif à la spécificité du marquage du traceur et un aspect physique relatif au volume de détection et à la sensibilité de SIC. Ces paramètres ont été évalués par simulations numériques pour les principaux isotopes utilisés en imagerie TEP dont les propriétés sont rappelées dans le tableau 1.

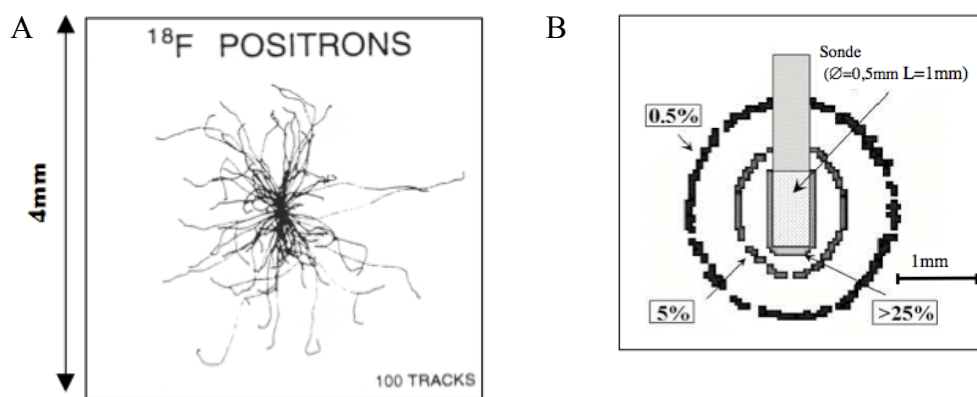


Figure 1. Simulations Monte Carlo des positrons du ^{18}F pour l'étude des paramètres physiques de la sonde. A) Trajectoire dans l'eau des positrons issus d'une source ponctuelle de ^{18}F . B) Iso-efficacités de détection à 25%, 5% et 0,5% pour une sonde composée d'une extrémité en scintillateur plastique, immergée dans une solution d'activité homogène en ^{18}F . A) Adapté de Levin & Hoffman 1999 B) Adapté de Pain et al 2000.

Isotope	Période	Energie moyenne (keV)	Energie maximale (keV)	Parcours maximum développé dans les tissus (mm)
^{18}F	1,829 h	249,3	633,5	2,3
^{11}C	20,38 min	385,5	960,1	3,95
^{15}O	2,04 min	491,8	1,1985	5,65

Tableau 1. Propriétés physiques d'isotopes pour l'imagerie TEP.

1.2 Evaluation des paramètres physiques par simulations Monte Carlo

Les simulations Monte Carlo (MC) ont permis d'évaluer le volume correspondant à 99 % du signal β détecté pour différentes configurations de sondes implantées dans un volume de tissus marqués de manière homogène pour différents isotopes et la sensibilité de détection associée (Tableau 2).

Tracer	Probe diameter (mm)	Scintillating tip length (mm)	Whole detection volume (μl)	Mean detection efficiency (%)	Theoretical sensitivity (Counts/kBq/ml)
^{18}F	0.5	1	17	1.49	0.25
^{18}F	1	1	20.7	2.7	0.56
^{11}C	0.5	1	46.6	1.1	0.51
^{11}C	1	1	72.1	1.7	1.23
^{11}C	0.5	1.5	57.7	1.37	0.79
^{15}O	0.25	0.8	190	0.15	0.29

Tableau 2. Volume de détection à 99%, efficacité de détection et sensibilité théorique associées pour différentes configuration sondes/traceur. (Adapté de Pain et al 2008)

Ces simulations ont permis de mettre en évidence l'adéquation des volumes de détection et de la sensibilité pour une sonde de 1mm de diamètre utilisée avec un traceur marqué au ^{18}F , avec le volume des structures cérébrales visées dans le cadre des projets du CERMEP (striatum, cervelet). Elles ont également fait apparaître que pour le ^{11}C et plus encore pour l' ^{15}O , les

volumes de détection excédaient les dimensions des structures cérébrales et qu'une quantification absolue de la fixation du radiotracer impliquerait une étape de modélisation supplémentaire.

Au final deux configurations peuvent être considérées quant aux capacités de quantification de la sonde :

- « *Configuration favorable* » les dimensions du noyau sont supérieures au volume de détection de la sonde (cf. cas A, figure 2). Dans cette hypothèse, considérée comme la plus favorable, la cinétique du traceur est directement obtenue par la mesure du taux de comptage normalisée par l'efficacité de détection de la sonde obtenue par étalonnage dans une solution d'activité volumique connue.
- « *Configuration complexe* » L'ensemble du volume de détection n'est pas « rempli » par la structure d'intérêt, soit du fait que la structure étudiée est un cortex situé en surface du cerveau (cf. cas B et C figure 2) soit du fait que la structure d'intérêt est de petites dimensions (cf. cas D figure 2). Dans ce cas la quantification absolue nécessite une estimation du recouvrement des volumes de la structure d'intérêt et du volume de détection ainsi que de l'efficacité associée. Ces résultats initiaux ont mené ultérieurement à des développements méthodologiques détaillés plus loin (paragraphe 1.5).

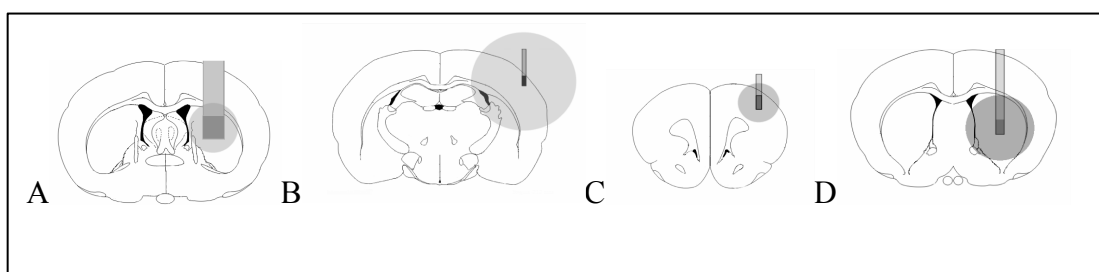


Figure 2. Différentes situations expérimentales associant différentes géométries de sonde, différents traceurs et différentes structures cérébrales. Le disque gris clair correspond au volume de détection centré sur l'extrémité sensible de la sonde (gris foncé) implantée dans les tissus cérébraux. Cas A : sonde de 1mm de diamètre, zone sensible de 1mm de hauteur associée au 18F-Fluorodeoxyglucose (18F-FDG) pour l'étude du striatum. Cas B : sonde de 0,25mm de diamètre, zone sensible de 0,5mm de hauteur de associée au 15O-H2O pour l'étude du cortex à tonneaux Cas C : sonde de 0,5 mm de diamètre , zone sensible de 1mm de hauteur associée au 18F-FDG pour l'étude du cortex frontal. Cas D : sonde de 0,5mm, zone sensible de 1 mm associée au 11C-raclopride pour l'étude du striatum. (Adapté de Pain et al 2008).

1.3 Bruit de fond γ généré par l'annihilation des positrons

Dans la configuration de détection de SIC, c'est évidemment la détection des β^+ qui génère le signal utile. Cependant, les γ de 511 keV, émis lors de l'annihilation des positrons dans les tissus, peuvent interagir avec la sonde et constituer une source de bruit significative. De ce fait, le choix d'un scintillateur organique plastique s'est imposé comme élément sensible de la

sonde. Il permet en effet une détection efficace des positrons tout en étant relativement transparents aux γ s de 511 keV générés dans tout le corps (soit hors de la zone d'étude) par l'annihilation des positrons. Des calculs analytiques pour une géométrie sphérique simplifiée (volume homogène d'activité β et γ identiques définis sur la figure 3) ont montrés un rapport du signal β sur γ environ 10 fois plus favorable pour un scintillateur organique type NE102 comparé à un scintillateur inorganique type NaI ou LSO (Pain et al. 2000; Pain et al. 2002).

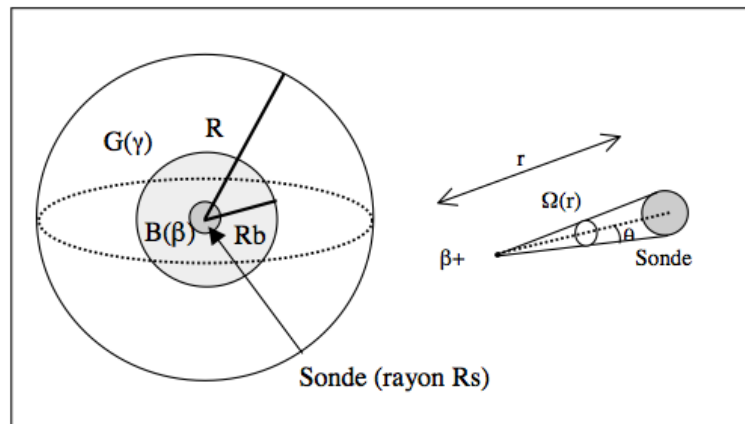


Figure 3. Géométrie considérée pour le calcul analytique du rapport entre le signal β et le bruit γ .

La possibilité de moduler le volume de détection par insertion de la sonde dans un tube constitué de matériau absorbant les β a été étudiée par simulations MC mais n'a pas été réalisée car elle impliquait des diamètres de sonde incompatibles avec une implantation in vivo (Pain et al 2002). Dans une première approche la contribution γ a pu être négligé sur la base de considérations analytiques pour l'efficacité de détection physique et géométrique pour des situations simplifiée où le marquage est homogène. Cependant, dans des configurations plus réalistes et moins favorables, la contribution au signal détecté du bruit de fond γ dépend également de l'accumulation du traceur dans certaines zones du corps hors de la zone d'intérêt. En effet quel que soit le traceur utilisé, une proportion importante est éliminée par les voies naturelles et va s'accumuler dans les reins et la vessie. Par ailleurs, certains traceurs comme le ^{18}F -FDG, marqueur de l'activité métabolique ne sont pas spécifiques d'un type cellulaire ou moléculaire et vont s'accumuler dans toutes les cellules et structures cérébrales (dans le cas du FDG dans toutes les cellules porteuses du transporteur du glucose). Le signal enregistré par la sonde dans une structure est alors augmenté d'une contribution γ émise hors de la zone d'étude visée. L'estimation de ces contributions est complexe puisqu'elle dépend de la géométrie de la sonde ainsi que de ses coordonnées d'implantation dans les tissus, qu'il faut convoluer avec la bio-distribution du traceur utilisé, donnée rarement disponible et variable au cours du temps.

Pour estimer le bruit de fond γ dans ces configurations, nous avons développée des simulations en géométries voxelisées pour deux des traceurs les plus utilisés en imagerie isotopique β^+ , le ^{18}F -FDG et le ^{11}C -raclopride. La géométrie voxelisée a été définie sur la base d'une image IRM haute résolution d'un rat en corps entier obtenu à l'institut Curie d'Orsay (Collaboration Marc Dhenain). 18 Organes principaux ont alors été segmentées manuellement sous le contrôle d'un physiologiste puis ces données ont été converties en une géométrie d'entrée pour le code de simulation MCNP via l'utilisation du logiciel SCMS (Yoriyaz et al. 2000) destiné initialement aux simulations en géométrie voxelisée pour l'imagerie clinique. Le processus depuis l'image IRM jusqu'à la géométrie voxelisée pour les simulations MC est illustré sur la figure 4.

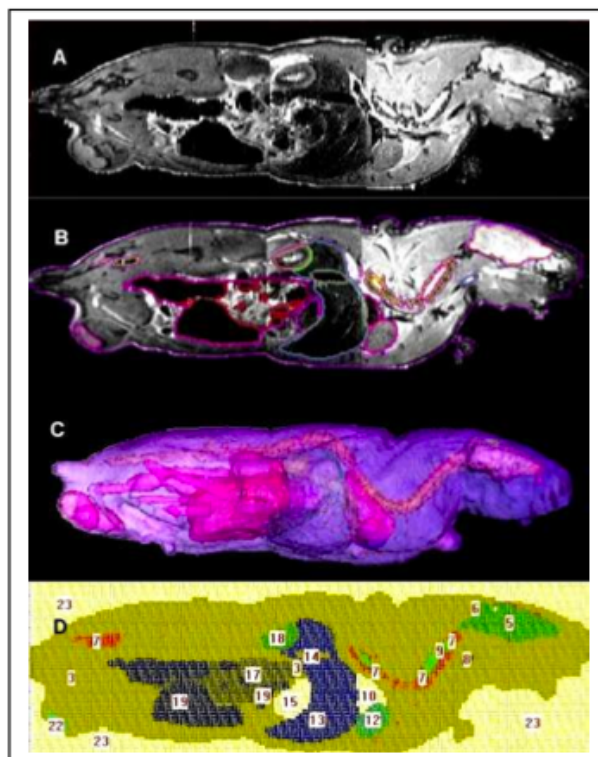


Figure 4 . Construction du fantôme voxelisé corps entier à partir d'une image IRM haute résolution (Collaboration institut Curie Orsay) A) image IRM anatomique haute résolution acquise à 4,7 T B) Image segmentée C) rendu volumique en 3D des structures segmentées D) coupe latérale de la géométrie voxelisée générée par le logiciel SCMS et utilisée par MCNP. (Adapté de Pain et al. 2008)

Nous avons pu mettre en évidence par les simulations MC en géométrie réaliste et en tenant compte de la biodistribution du traceur que la contribution des différentes sources de bruit γ est limitée et est d'autant plus faible que le traceur est spécifique (tableau 3). Ainsi, pour le ^{11}C -raclopride, traceur spécifique des récepteurs dopaminergique D2, le bruit de fond γ contribue à hauteur d'environ 1,7% au signal mesuré par la sonde, aucune contribution n'excédant 0,1% sauf celle issue du foie. Pour le ^{18}F -FDG, traceur métabolique n'ayant pas de cible moléculaire

spécifique, la contribution principale vient des tissus cérébraux proches de la zone d'intérêt qui génèrent près de 6% des signaux mesurés par la sonde. Cette contribution non négligeable correspond au cas de figure le plus défavorable et peut être minimisée en optimisant la géométrie de la sonde, en particulier en jouant sur le rapport entre la surface de la zone sensible et son volume.

Organ	Calculated total 511 keV gammas detection efficiency for a probe implanted in the rat striatum $E_i^\gamma(\vec{r})$ (10^{-4} %)	$^{18}\text{F-FDG}$		$^{11}\text{C-Raclopride}$	
		Mean Biodistribution kBq / ml	Contribution to total Microprobe signal $\frac{S_\gamma(t)}{S_\beta(t)+S_\gamma(t)}$ (%)	Mean Biodistribution kBq / ml	Contribution to total Microprobe signal $\frac{S_\gamma(t)}{S_\beta(t)+S_\gamma(t)}$ (%)
Brain	5.500 ± 0.230	198 ^a	5.72	10 ^c	0.5
Eyes (Harderian glands)	0.350 ± 0.059	100 ^b	<0.01	152 ^c	<0.01
Heart	0.110 ± 0.033	796 ^a	0.22	60 ^d	-0.02
Lungs	0.110 ± 0.033	157 ^a	0.14	60 ^d	-0.06
Liver	0.080 ± 0.028	695 ^a	0.25	240 ^d	-0.97
Kidneys	0.056 ± 0.022	258 ^a	0.04	60 ^d	-0.01
Large intestine	0.070 ± 0.026	187 ^a	0.31	30 ^d	-0.06
Small Intestine	0.01 <	150 ^a	0.04	30 ^d	-0.01
Bladder	0.01 <	1227 ^a	0	120 ^d	<0.01
Total			6.72		1.65

^a van Waarde et al. 2004, ^bKuge et al. , 1997, ^cHume et al., 1996

Tableau 3. Efficacité de détection des γ de 511 keV pour une sonde SIC de 500 micromètres de diamètre implantée dans le striatum d'un rat et contribution au signal global ($\gamma + \beta$) mesuré par la sonde en tenant compte de la biodistribution des traceurs considérés. (Pain et al. 2008)

1.4 Défis technologiques pour la construction de la sonde intracérébrale.

1.4.1 Architecture générale

A l'issue de ma thèse une première version du détecteur a été développée selon l'architecture présentée sur la figure 5. La sonde radiosensible est implantée par chirurgie stéréotaxique chez l'animal anesthésié. Les expériences peuvent être réalisées en aigu ou en chronique. Dans ce dernier cas, un connecteur optique cimenté sur le crâne de l'animal permet de relier lors des expériences la sonde via un guide lumineux en fibre optique à un module de photodétection indépendant qui comporte un photomultiplicateur (PMT), son pont de polarisation et un convertisseur haute tension. Les impulsions analogiques générées par l'interaction des photons avec le PMT sont alors analysées par une échelle de comptage et un

analyseur multicanaux qui permettent d'enregistrer simultanément le taux de comptage et la spectroscopie en énergie des événements détectés. Ces informations sont numérisées via une carte de codage analogique –digital associée à un PC et une interface écrite sous Labview.

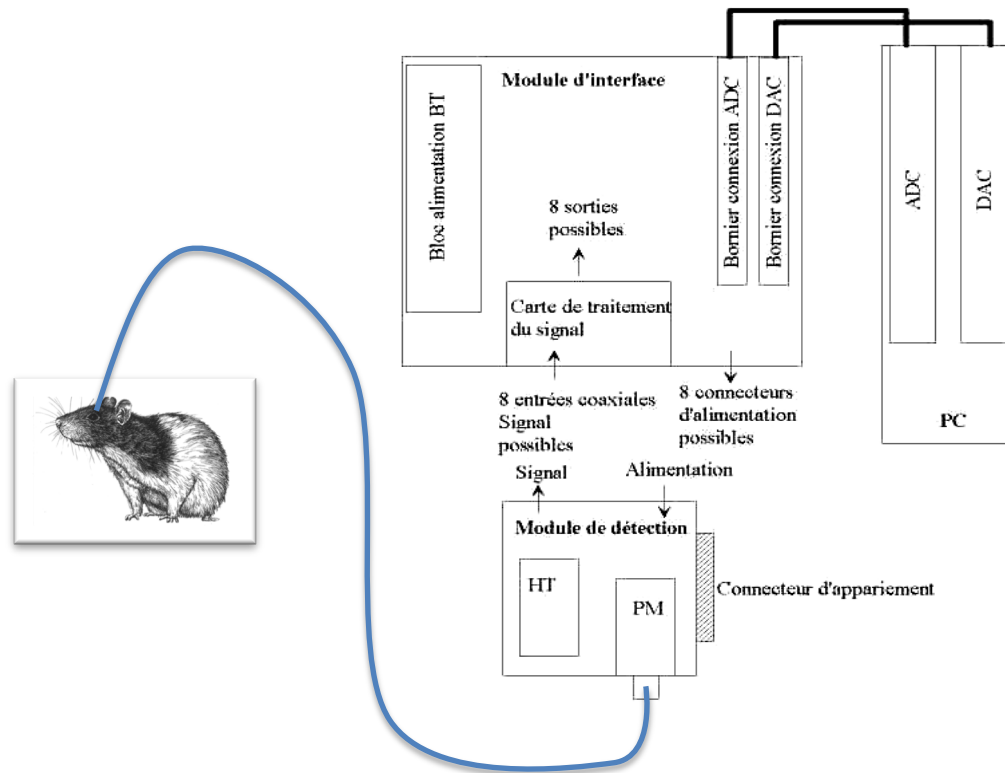


Figure 5. Architecture générale de détection pour la sonde SIC

1.4.2 Choix technologiques

Afin de réaliser ce dispositif nous avons effectué des choix et des mises au point technologiques en particulier au niveau de la sonde et de l'étage de photo-détection (Pain et al. 2002). Le scintillateur constitue la zone sensible de la sonde et doit être choisi selon 3 critères :

- 1 - une efficacité de scintillation optimale pour des particules β^+ d'énergies comprises entre 1keV et 2MeV, associée à une faible sensibilité pour les γ d'annihilation à 511keV.
- 2 - des propriétés physiques compatibles avec un conditionnement sous forme d'un petit volume.
- 3 – sa biocompatibilité présumée, puisque le scintillateur est destiné à être implanté au sein des tissus biologiques.

La nécessité d'optimiser le rapport entre le signal β et le bruit γ nous a conduit au choix d'un matériau scintillant de type plastique. En effet, ces scintillateurs possèdent des densités faibles,

de l'ordre de 1g/cm^3 , qui leur confèrent une faible efficacité de détection des γ tout en offrant une efficacité de détection satisfaisante des β . Cette propriété avait d'ailleurs déjà été exploitée pour la réalisation de sondes peropératoires utilisées en cancérologie, dans le cadre de la détection d'un signal β faible en présence d'un large bruit de fond γ (Daghighian et al. 1994). Les scintillateurs plastiques, qui présentent l'avantage d'être des matériaux peu coûteux, existent sous forme de fibres scintillantes qui ont été développées dans les années 80 pour la réalisation de détecteurs à localisation pour la physique des particules. Comparées aux scintillateurs plastiques classiques, les fibres scintillantes ne sont pas constituées d'un matériau homogène mais d'une enveloppe de quelques μm d'épaisseur, appelée «gaine » qui entoure un «cœur » constitué de matériau scintillant. La différence d'indice optique entre ces deux matériaux permet la conduction de la lumière par réflexion totale assurant ainsi une collection efficace de la lumière de scintillation. Cette caractéristique constitue un atout essentiel dans la configuration de détection de SIC qui met en jeu des niveaux de lumière très faibles. Afin de limiter le volume de détection autour de l'extrémité seule de la sonde implantée, seul le bout de la sonde est constitué de fibre scintillante, la lumière produite par interaction des particules dans le scintillateur est alors guidée hors des tissus via une fibre non scintillante dont la longueur (quelques mm) est déterminée en fonction de la profondeur de la structure cérébrale visée. Cette association de fibre scintillante et fibre claire non dopée constitue la sonde proprement dite qui peut être implantée chroniquement pour des durées allant jusqu'à plusieurs mois. Lors des expériences, un guide optique constitué d'une fibre optique plastique de large diamètre est branché sur la sonde afin de guider la lumière de scintillation jusqu'au photodétecteur. Cette géométrie, illustrée sur la figure 6, a été définie en collaboration avec Jean Marc Edeline et Bernard Hars du laboratoire Neurobiologie de l'Apprentissage et de la Mémoire à Orsay.

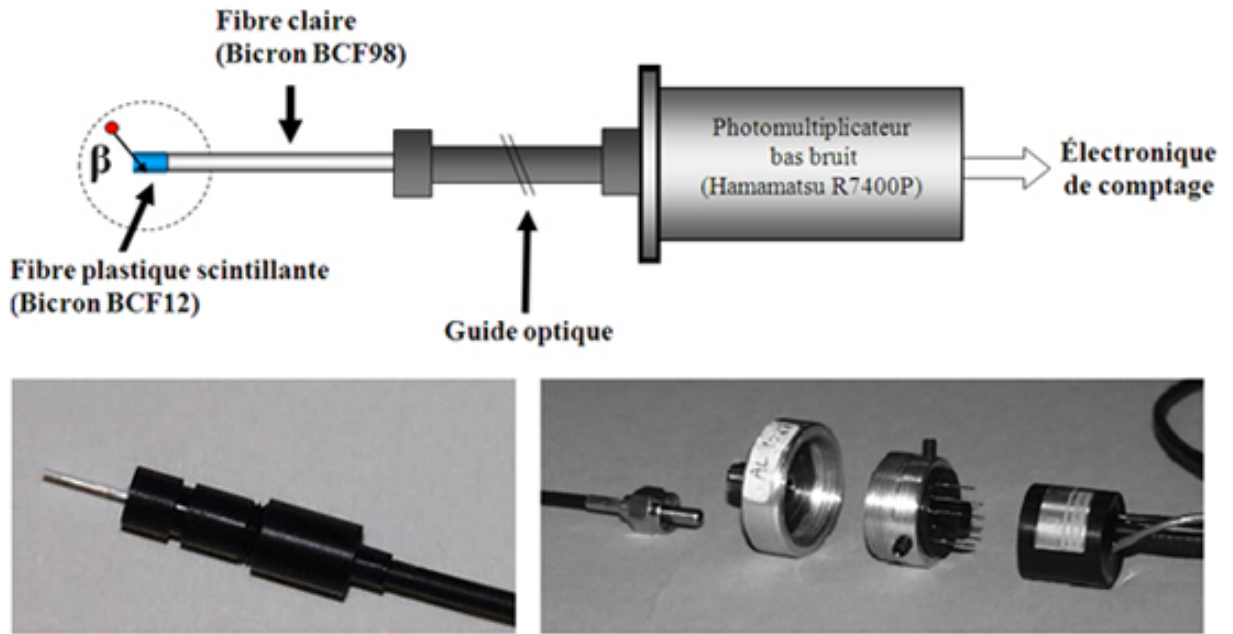


Figure 6. Chaîne de photo-détection de la sonde SIC. A) schéma général incluant la sonde, le guide optique et le photodétecteur B) Sonde SIC de diamètre 500 micromètres insérée dans une fêrulle en delrin collée dans un connecteur miniaturisé permettant l'association reproductible et avec des pertes optiques limitées avec le guide optique C) De gauche à droite, extrémité en connexion SMA du guide optique, pièce d'interface avec le photomultiplicateur, PMT inséré dans une pièce de connexion filetée, embase de polarisation du PMT et sortie du signal détecté

Un des enjeux techniques du projet a été la réalisation d'épissures ayant des bonnes propriétés optiques et mécaniques entre deux fibres optiques scintillante et claire de faible diamètre. Dans un premier temps un partenariat a été mené avec Franz Kniest de la société Bicron qui a permis d'obtenir des échantillons à façon dès 1999. Afin de pouvoir obtenir facilement différentes configurations de sondes, j'ai par la suite modifié un prototype de machine à épissure pour fibre plastique initialement développée au CEA Saclay pour l'expérience de physique des particules D0. Des épissures avec une transmission supérieure à 90 % ont été obtenues en routine (1mm fin 2000 puis 500 micromètres et enfin 250 micromètres en 2004 (Aurélie Desbrée et al. 2008), avec une tenue mécanique qui permettait implantation et éventuellement explantation des sondes. Les pertes de lumières aux interfaces sonde/guide optique et guide optique/PMT ont été optimisées par la réalisation de guide optique et de connecteurs sur mesure, en particulier avec le concours de Pierre Jacquemet de la société Luxeri située à Gometz le Chatel (91). Un connecteur optique miniaturisé permet l'interfaçage reproductible entre la sonde et le guide de lumière. Après évaluation de différentes alternatives (photodiode à avalanches en mode Geiger, tube hybride PMT/Si chaneltron), le choix du photodétecteur s'est porté vers un nouveau type de photomultiplicateur de structure ultra

compacte et de bruit d'obscurité faible (R7400P Hamamatsu). Afin de maximiser la sensibilité de notre dispositif en évitant un seuillage en énergie pour rejeter le bruit électronique et le courant d'obscurité, un protocole de tri des photomultiplicateurs sur la base d'un bruit d'obscurité inférieur à 5 coups/s a été défini avec la société Hamamatsu. Les conditions de polarisations optimales ont été étudiées tant du point de vue de la sensibilité, du rapport signal sur bruit que de la stabilité des signaux sur la durée d'une expérience (drift et shift sont largement inférieurs à 1%).

1.4.3 Performances instrumentales du système développé

La mise en œuvre expérimentale du dispositif complet a été réalisée en immergeant la sonde dans des solutions aqueuses d'activités connues et homogènes en ^{18}F -FDG. Ces mesures de caractérisations ont confirmé expérimentalement la sensibilité de la sonde évaluée par simulation MC autour de 0,2cps /kBq/ml pour le ^{18}F et 0,33cps/kBq/ml pour le ^{11}C pour une sonde de 0,5mm de diamètre et 1mm de hauteur de fibre scintillante en extrémité. Elles ont également montré la linéarité de la réponse en fonction de la concentration d'activité sur une gamme allant de quelques kBq/ml à 2000kBq/ml couvrant largement les concentrations attendues lors des expériences in vivo.

La résolution temporelle constitue un paramètre essentiel pour l'étude de phénomènes cérébraux rapides. En pharmacocinétique, par exemple, l'étude de l'évolution (diminution ou augmentation ponctuelle) de la fixation locale d'un traceur à la suite d'une stimulation, requiert une résolution temporelle de l'ordre de la seconde. Lors des expériences qui mettent en jeu une injection de radiotracer brève, on observe un effet « bolus », qui se traduit par une augmentation rapide de la concentration du radiotracer dans le sang. Le suivi cinétique de la concentration radioactive nécessite, là encore, la réalisation de mesures avec une résolution temporelle de l'ordre de la seconde. Pour la mesure de concentrations radioactives, la résolution temporelle dépend à la fois des performances du système de détection et de l'activité radioactive détectable. En effet, si l'activité injectée est importante, il est possible d'utiliser une fréquence d'échantillonnage élevée sans introduire de biais. A l'inverse, un taux de signal faible nécessite l'utilisation d'une fréquence d'échantillonnage adaptée, afin d'obtenir une statistique de comptage satisfaisante. Par ailleurs, lors de la réalisation de mesures cinétiques à l'aide d'isotopes de demi-vie courte, le niveau de signal détectable diminue rapidement au cours de l'expérience. Le signal mesuré en fin d'expérience peut alors devenir très faible (quelques coups/s), ce qui impose d'adapter la fréquence de prise de données. Afin de tenir compte du compromis entre ces différentes contraintes, la période d'échantillonnage de SIC a été fixée à

1s, tout en maintenant la possibilité d'intégrer les données a posteriori sur des temps plus longs. La fréquence élevée de prise de données tout au long de l'acquisition constitue un avantage substantiel de SIC sur les systèmes de radio-tomographie. En effet, les algorithmes de reconstruction utilisés alors en TEP ou TEMP, demandaient dans les années 2000 une statistique expérimentale importante qui imposait l'intégration du signal sur plusieurs dizaines de secondes voire plusieurs minutes du fait d'une sensibilité limitée des radio-tomographes. Si des améliorations substantielles de la sensibilité et donc de la résolution temporelle des radio tomographes ont été réalisés, la réalisation de séquence à haute fréquence d'échantillonnage produit des quantités énormes de données et n'est que rarement réalisée sur des durées importantes. L'avantage de la résolution temporelle élevée du détecteur SIC demeure donc toujours pertinent en 2012.

1.5 Développements méthodologiques ultérieurs

1.5.1 Quantification absolue

L'un des intérêts majeurs des techniques isotopiques parmi les techniques d'imagerie du vivant réside dans leur capacité à produire des données quantitatives sur les paramètres fonctionnels. Mes travaux initiaux (2000-2002) se sont focalisés sur des structures cérébrales de larges dimensions (striatum, cervelet) dans la configuration favorable définie au paragraphe 1.2. Pour la mise en œuvre du détecteur dans la configuration complexe où seule une partie du volume de détection est occupée par la structure d'intérêt, une évaluation des contributions des différentes structures est nécessaire afin de corriger la sous estimation de la concentration d'activité dans la structure étudiée. Cet effet est proche de l'effet de volume partiel connu en imagerie lorsque la dimension des voxels est supérieure à la dimension des objets étudiés, ce qui, pour l'imagerie isotopique, conduit à une dilution de la concentration d'activité radioactive mesurée par rapport à la concentration réelle.

Pour répondre à cette question une première étape a consisté à réaliser des simulations MC en géométrie simplifiée. Cette approche a été menée pour les études pharmacocinétiques des traceurs des récepteurs sérotoninergiques 5HT1A au niveau du raphé, structure de volume réduit (quelques microlitres) (Zimmer et al. 2002). Pour ces études, un premier résultat consiste à obtenir et comparer des cinétiques du traceur sous différentes situations physiologiques, en particulier en faisant varier la concentration extracellulaire de sérotonine par injection d'un produit pharmaceutique. Ces mesures relatives constituent pour les neurobiologistes des résultats importants, en particulier pour les études pharmacocinétiques. Cependant pour tendre

vers la quantification absolue, j'ai réalisé la modélisation de la géométrie de détection incluant la sonde, ses coordonnées d'implantation, la géométrie des structures cérébrales environnantes et la bio-distribution du traceur étudiée (A Plenevaux et al. 2000).

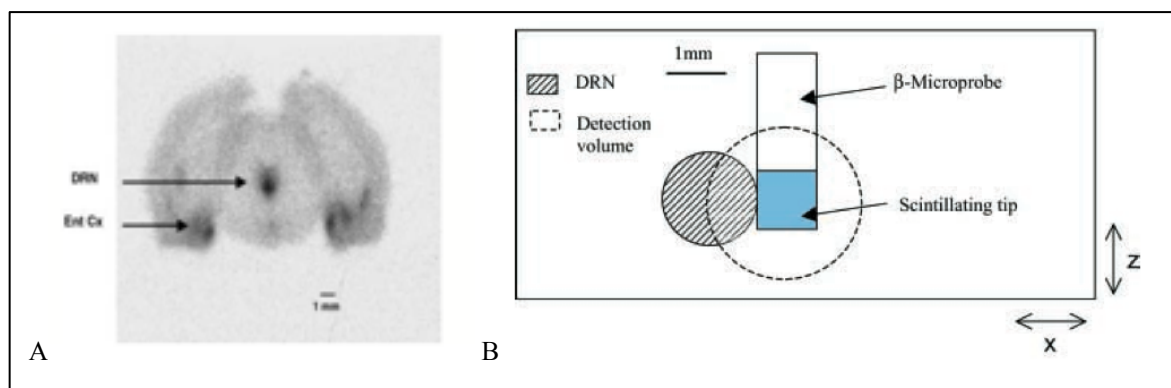


Figure 7. Modélisation simplifiée pour la quantification de la fixation du ^{18}F -MPPF dans le noyau du raphé dorsal (DRN) A.) Biodistribution du traceur obtenue par imagerie autoradiographique d'une coupe frontale de cerveau de rat obtenue 40 minutes après injection du traceur. On observe l'accumulation spécifique du traceur dans les structures présentant les récepteurs cibles 5HT1A (DRN et cortex entorhinal). B.) Géométrie de détection pour la simulation MC. On observe qu'une faible proportion du volume de détection est occupée par des tissus du raphé. (L Zimmer et al. 2002). Sans rentrer dans les détails, l'étude MC a permis de démontrer indirectement la reproductibilité de la procédure d'implantation. Nous avons également fait apparaître la difficulté à comparer les données auto radiographiques et celles obtenues in vivo en imagerie TEP ou avec la sonde intracérébrale du fait de différences méthodologiques intrinsèques, en particulier la contribution de la radioactivité présente dans le sang

Une simulation en géométrie simplifiée illustrée sur la figure 7-B, est bien adaptée pour le noyau du raphé où le marquage hors structure d'intérêt est éloigné (cortex entorhinal visible sur la figure 7 A) et où la structure possède une forme géométrique simple. Pour des situations plus complexes où le volume de détection contient plusieurs structures marquées, ou lorsque les structures ont des géométries tridimensionnelles complexes (l'hippocampe par exemple) nous avons développé un modèle numérique voxelisé de cerveau de rat à partir de la numérisation de l'atlas cérébral de rat de référence (Paxinos et Watson, 1998). Comme illustré sur la figure 8, le principe de la simulation repose sur la superposition dans le volume anatomique 3D, de la matrice des efficacités de détection locale, calculée au préalable en fonction de la géométrie de la sonde et de l'isotope utilisé (Pain et al. 2008).

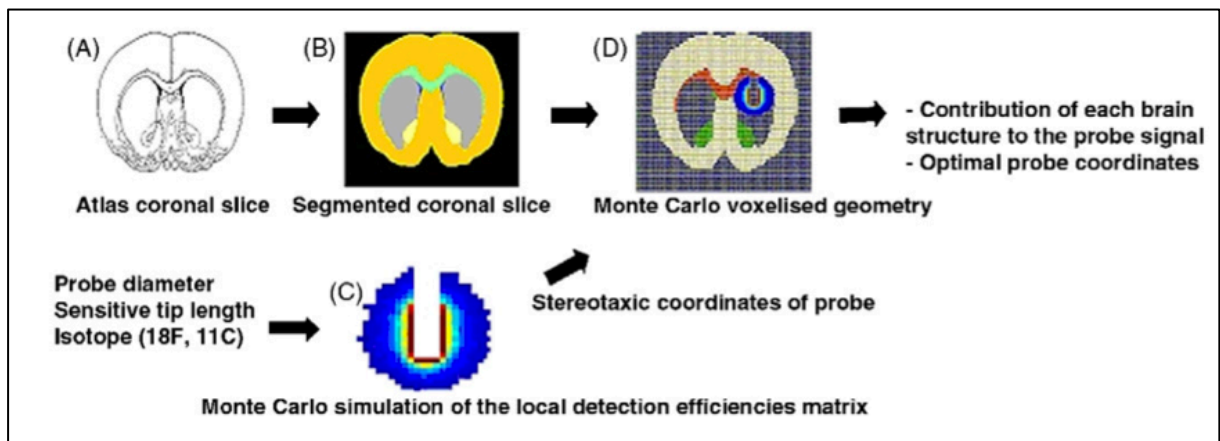


Figure 8. Principe de la simulation pour la quantification absolue de la sonde SIC. A) Coupe frontale de l'atlas de cerveau de rat de référence (Paxinos et Watson 1998). B) Coupe frontale segmentée C) Matrice 3D des efficacités locales calculées par simulation MC. D) Superposition 3D de la matrice des efficacités locales et de la géométrie voxelisée. (Adapté de Pain et al 2008)

Ce travail a permis :

- 1 - de fournir des données étonnamment difficiles à trouver dans la littérature sur les volumes des structures cérébrales chez le rat
- 2- de réévaluer la quantification des études précédentes menées soit directement au sein de notre équipe et/ou par nos collaborateurs, ou par d'autres groupes utilisateurs de la version commercialisée de la sonde intracérébrale.
- 3- de proposer une méthode d'optimisation du choix des coordonnées d'implantation stéréotaxiques ainsi que d'étudier l'influence de la précision de l'implantation sur la quantification (figure 9)

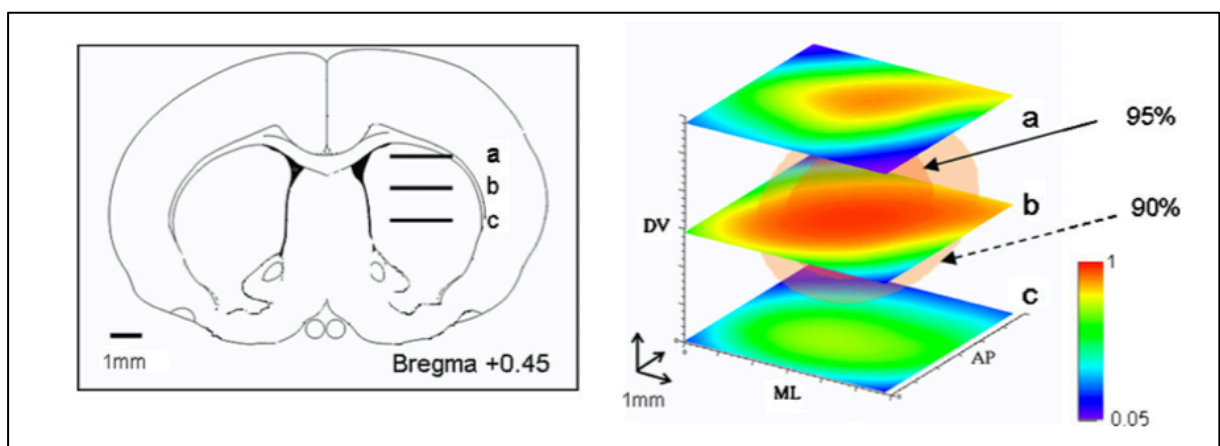


Figure 9. Optimisation des coordonnées stéréotaxiques. On illustre ici le cas d'une implantation d'une sonde de 500 microns de diamètre et 1mm de long pour la zone sensible dans le striatum, pour la mesure du ^{11}C -raclopride. Chaque pixel de la matrice représente le rapport entre le signal mesuré par rapport à celui mesuré pour les coordonnées optimales. Les iso-volumes à 90% et 95% sont indiqués par les flèches et représentés en orange foncé et clair.

(Adapté de Pain et al 2008)

Ces développements se sont concrétisés par la mise à disposition de la communauté d'utilisateurs d'une interface Matlab pour l'évaluation des volumes de chaque structure incluse dans le volume de détection, pour des coordonnées stéréotaxiques données. L'efficacité de détection associée pour chaque structure permet si la bio-distribution du traceur est connue de déterminer la contribution au signal mesuré pour chaque noyau cérébral à proximité de la sonde.

1.5.2 Multimodalité

L'un des intérêts revendiqué de la sonde intracérébrale par rapport aux imageurs tomographiques est son instrumentation relativement légère qui a permis son association avec différentes modalités utilisées en recherche en neurosciences. L'objectif est dans tous les cas de mesurer sur un même animal, lors d'une même expérience des paramètres complémentaires fonctionnels et/ou anatomiques. En effet, la simultanéité de la mesure de différents paramètres s'impose lorsque les phénomènes étudiés sont dynamiques afin de pouvoir superposer, sans recalage, les décours temporels des paramètres mesurés. Par ailleurs, pour les études *in vivo*, la mesure simultanée chez un même animal plutôt que différentes mesures séquentielles chez un ou plusieurs animaux, permet de s'affranchir des variations de l'état physiologique observées chez tout animal anesthésié et d'éliminer les variations interindividuelles entre animaux.

La première association de techniques a été le couplage de la sonde SIC avec des techniques invasives classiques utilisant des électrodes en voltamétrie (V. Leviel, données non publiées), puis en microdialyse avec la sonde SIC chez un même animal. L'association de la mesure isotopique avec la microdialyse a été rendu possible sans développements instrumentaux supplémentaires grâce à la souplesse de l'instrumentation de SIC (Zimmer et al. 2002a 2002b). L'implantation d'électrodes supplémentaires se fait dans le même système stéréotaxique chez l'animal anesthésié. Nous avons ainsi démontré la possibilité d'implanter 3 sondes (2 sondes SIC et une sonde de microdialyse) chez un même rat anesthésié (figure 10). A contrario, les tomographes petits animaux sont généralement constitués d'une couronne de détection qui entoure l'animal, ce qui rend problématique l'insertion d'électrodes (ou d'autres appareils de mesures). L'association de SIC et de la microdialyse a donc permis d'obtenir des

données pharmacocinétiques nouvelles qui seront présentées dans la seconde partie de ce chapitre.

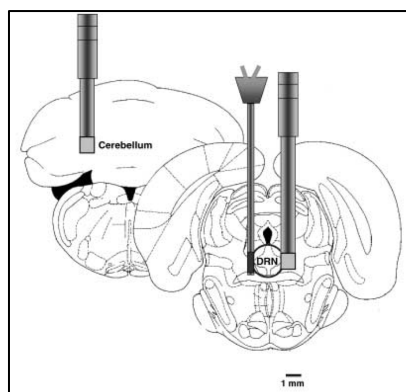


Figure 10. Couplage de la sonde SIC et de la microdialyse. Schéma d'implantation de deux sondes SIC et d'une sonde de microdialyse pour l'étude de la pharmacocinétique du ^{18}F -MPPF dans le noyau du raphé dorsal (DRN).

La seconde association a visé la combinaison des techniques IRM et la sonde SIC, et a constitué le sujet de la thèse d'Aurélié Desbrée (2002-2005) pour laquelle j'ai participé fortement à l'encadrement. L'objectif initial était la mesure de la cinétique de molécules radio marquées (^{18}F -FDG) et l'acquisition simultanée de spectres biochimiques en spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (SRMN). Une des cibles était en particulier les intermédiaires du cycle de Krebs marqués au ^{13}C sur la base de travaux réalisés précédemment par nos collaborateurs (Henry et al. 2002). Les discussions préliminaires avec le groupe de Vincent Lebon (URA2210 au Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ), Orsay) ont montré que la sensibilité réduite des techniques SRMN imposait à l'époque une résolution spatiale de quelques centaines de mm^3 , incompatible avec l'étude de l'activation d'une structure cérébrale précise.

Nous avons donc réorienté le projet vers l'acquisition non plus de spectres SRMN mais d'image anatomiques IRM avec pour objectifs la localisation de la sonde et la combinaison d'information fonctionnelles et anatomiques. Du point de vue de l'instrumentation, la présence de champ magnétique intenses et d'ondes radiofréquence dans les appareils IRM, impose des contraintes fortes pour réaliser le couplage entre l'imagerie par émission de positron et l'IRM. Cette association discutée de longue date a longtemps été limitée par la sensibilité aux champs magnétiques de l'électronique d'acquisition et des tubes photomultiplicateurs. Dès 2001, nous avons entrevu la possibilité d'associer l'imagerie IRM à la mesure de molécules radio-marquées par la sonde SIC. En effet, les PMT utilisés (R7400P), étaient peu sensibles aux champs magnétiques du fait de leur architecture originale avec des dynodes très proches. La sonde elle même, constituée de fibre optique était également insensible au champ. Lors de la

thèse d'Aurélie Desbrée, j'ai initié les travaux de simulations numériques qui ont permis d'évaluer l'influence du champ magnétique sur la trajectoire des positrons et donc sur le volume de détection associé. Nous avons ainsi montré une diminution importante du volume de détection (figure 11) qui se traduit cependant par une diminution modérée de l'activité mesurée. Cette diminution est d'autant plus marquée que l'isotope considéré est énergétique (Desbrée et al. 2004). Au final, la présence d'un champ magnétique intense tend à légèrement modifier les conditions de détection en diminuant le volume de détection (donc en augmentant la résolution spatiale) et en ayant peu d'incidence sur l'activité totale mesurée. Les matrices des efficacités de détection locales ont été évaluées pour différentes géométries et différents champs (3 et 7 T), et ont été intégrées à l'outil de quantification décrit au paragraphe 1.5.1

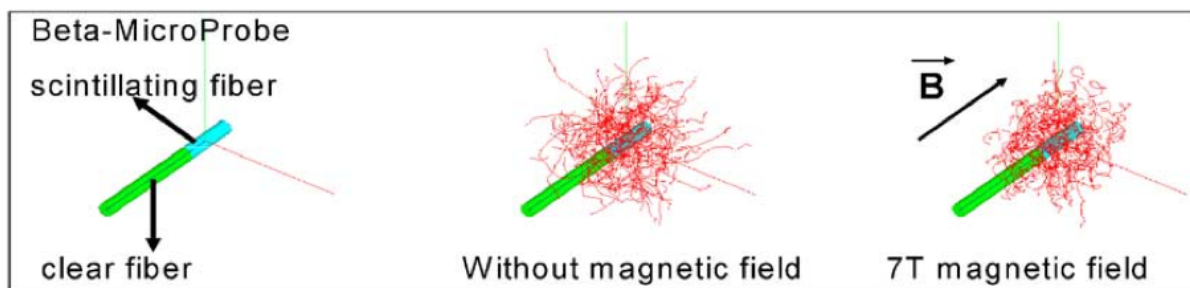


Figure 11. Influence d'un champ magnétique sur le volume de détection de la sonde intracérébrale. On illustre ici le cas d'un traceur marqué à ^{15}O et d'un IRM avec un champ fixe de 7Tesla. On observe la courbure des trajectoires des positrons due au champ magnétique, qui conduit à une diminution du volume de détection.

Les expériences de validations ont été réalisées au CERMEP de Lyon sur la plateforme d'imagerie du petit Animage, qui comporte un imageur IRM Bruker dédié au petit animal, des guides optiques de 8m ont été utilisés afin de placer les photomultiplicateurs et l'électroniques d'acquisition au delà d'une zone où le champ est inférieur à 50 mTesla. Ces travaux menés en collaboration avec le CERMEP, ont permis

- 1- de visualiser la position des sondes implantées par imagerie IRM anatomique (figure 12 A et B).
- 2- De comparer les mesures sous champ et hors champ chez un même animal, des cinétiques d'accumulation d'un radio-traceur (figure 12 C).

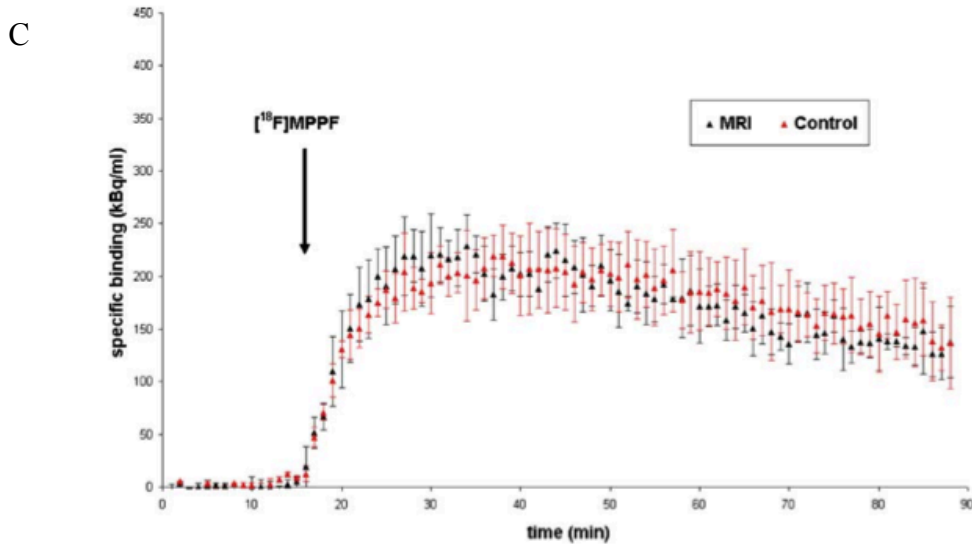
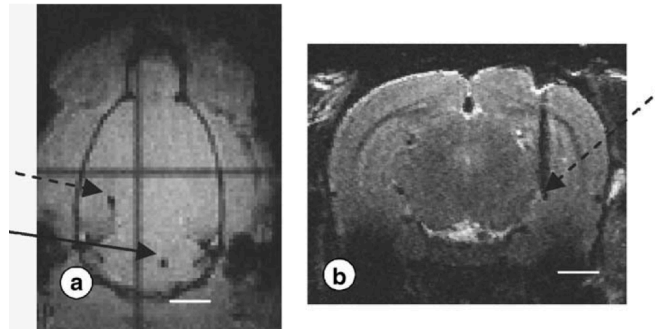


Figure 12 Association SIC – IRM. A) Image IRM anatomique en vue axiale de la tête du rat. Les deux points noirs indiqués par des flèches correspondent aux deux sondes implantées. B) image IRM anatomique en vue coronale de la tête de rat. La flèche noire indique la trace de la sonde implantée dans l'hippocampe. C) Comparaison des cinétiques d'accumulation du traceur mesurées par la sonde SIC sous champ et hors champ. (Adapté de Desbrée et al. 2007).

2 Etudes in vivo chez le rongeur anesthésié avec la sonde intracérébrale radiosensible

Comme indiqué au début de ce chapitre, le développement de la sonde SIC répondait initialement à une demande des neurobiologistes et radio-biologistes du CERMEP de Lyon. Au cours des premiers développements, nous avons rapidement débordé du cadre initial des applications potentielles en poursuivant deux thématiques en parallèles. La première, menée au CERMEP (Vincent Leviel puis Luc Zimmer) et au SHFJ d'Orsay (Philippe Hantraye, Laurent Besret) s'est intéressée aux études pharmacocinétiques in vivo dans les systèmes dopaminergique et sérotoninergique. La seconde, s'est intéressée à l'étude de la molécule « standard » en imagerie TEP, le ^{18}F -FDG, un analogue du glucose radio marqué au ^{18}F . Cette

seconde thématique s'est d'abord imposée pour la validation du détecteur du fait de la disponibilité facile de ce traceur (le seul à l'époque à être synthétisé quotidiennement et par des unités automatisées), puis pour l'étude du métabolisme énergétique cérébral. Dans les paragraphes qui suivent, je vais brièvement résumer les protocoles expérimentaux pour les mesures in vivo avec SIC, et les principaux résultats obtenus en collaborations avec des biologistes au SHFJ et au CERMEP.

2.1 Pharmacocinétique

Mesure de fixation compétitive dans le système dopaminergique (collaboration CERMEP/ SHFJ)

Les études pharmacocinétiques menées avec SIC ont dans un premier temps concerné la fixation d'un traceur spécifique des récepteurs dopaminergiques D2, le ^{11}C -raclopride. Ces études ont été menées en collaboration étroite avec le centre d'imagerie TEP de Lyon (Vincent Leviel puis Luc Zimmer). Ce traceur avait été utilisé notamment par le groupe du MRC Hammersmith à Londres pour l'étude du système dopaminergique chez le rongeur et les premières études in vivo avec les premiers radio-tomographes TEP alors en cours de validation ((Hume et al. 1992). Nos études ont nécessité l'implantation de deux sondes, l'une dans la structure cérébrale d'intérêt (le striatum) l'autre dans une zone « témoin » dépourvue de récepteurs D2 (le cervelet). La fixation spécifique du traceur est obtenue par soustraction de la cinétique témoin à la cinétique mesurée simultanément dans la zone d'intérêt, après normalisation de la sensibilité des sondes et correction de la décroissance radioactive.

Le système dopaminergique est impliqué dans de nombreuses fonctions (cognition, fonction motrices, motivation et récompense, sommeil, mémorisation). Nous nous sommes intéressés à la libération de dopamine dans le noyau caudé (striatum dorsal). Cette structure appartient à la voie nigro-striée constituée de neurones dopaminergiques de la substance noire compacte qui projettent vers le striatum. La dégénérescence de ces neurones est observée chez les malades atteints de maladie de Parkinson. Nous avons pu mesurer les cinétiques de fixation du raclopride dans le striatum et le cervelet et en déduire la fixation spécifique dans le striatum (figure 13 B). Ces données ont été comparées aux études ex vivo réalisées auparavant par autoradiographie et ont montrés des niveaux de fixation spécifique et non spécifique similaires, 40 minutes après injection, tout en apportant un paramètre supplémentaire : la dynamique de fixation. Au-delà de cette première étude, le caractère transitoire de l'association entre le traceur (on parle de traceur « déplaçable ») et les récepteurs a permis la réalisation de mesure de fixation

compétitive où le traceur radio-marqué est en compétition avec la dopamine endogène (Zimmer et al. 2000). L'ensemble de ces résultats est résumé sur la figure 13. La sonde SIC a montré dans ces études son potentiel par rapport aux tomographes microTEP puisqu'elle a permis des mesures in vivo des cinétiques de fixation avec une résolution temporelle de l'ordre d'une seconde alors que les microTEP étaient limités à des résolutions temporelles de l'ordre de plusieurs dizaine de secondes. Cette résolution temporelle a été exploitée par la suite pour obtenir à l'aide d'un protocole multi-injections, les paramètres pharmacocinétiques (affinité du traceur et densité en récepteurs) in vivo du raclopride (Mauger et al, 2005), et de les comparer avec les paramètres in vitro.

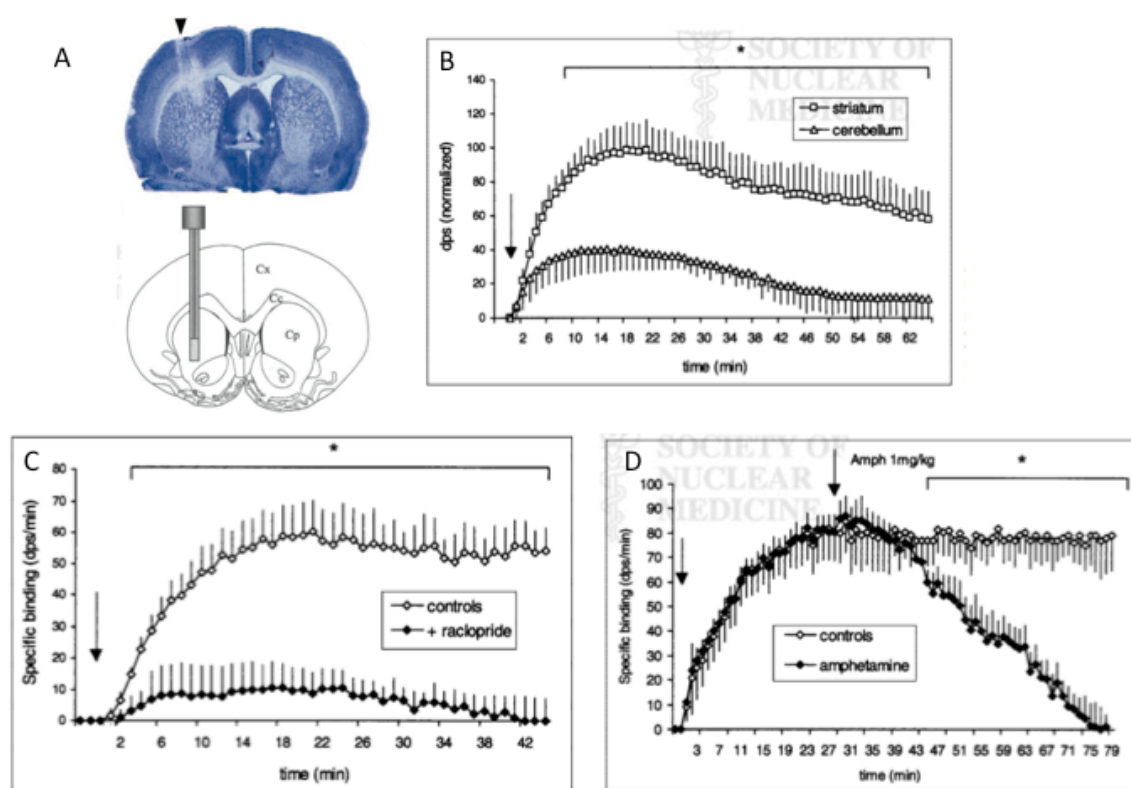


Figure 13. Pharmacocinétique du ^{11}C -raclopride mesurée par la sonde SIC. A) Implantation stéréotaxique de la sonde SIC dans le striatum. En haut, contrôle post mortem après coloration au crésyl violet. La flèche indique le point de pénétration de la sonde dans le tissu. En bas, schéma sur la coupe coronale correspondante d'un atlas de cerveau de rat (Paxinos and Watson, 1998). B) Courbes cinétiques normalisées de la sensibilité des sondes pour le striatum et le cervelet (zone à très faible concentration en récepteurs cibles du ^{11}C -raclopride) C) Fixation spécifique du ^{11}C -raclopride dans le striatum en condition contrôle et sous compétition avec du raclopride non marqué. D) Fixation spécifique du ^{11}C -Raclopride dans le striatum en condition contrôle et après injection d'amphétamine. (Adapté de Zimmer et al 2002)

Mesure de fixation compétitive dans le système sérotoninergique ; couplage avec la microdialyse (collaboration CERMEP)

Fort de ces premiers succès, nous avons poursuivi nos travaux avec l'étude d'un traceur du système sérotoninergique, le ^{18}F -MPPF qui se fixe réversiblement sur les récepteurs sérotoninergiques 5HT_{1A}. Ce traceur développé constitue un outil de choix pour les études précliniques et cliniques (Le Bars et al. 1998; Plenevaux et al. 2000). En effet la sérotonine joue un rôle neurotransmetteur et neuromodulateur dans le système nerveux central en participant au développement cérébrale et régulant un large spectre de fonctions chez l'adulte. Des dysfonctionnements du système sérotoninergique sont observés pour de nombreuses pathologies cérébrales en particulier, l'anxiété, la dépression, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie. La simplicité d'utilisation de la sonde a permis le couplage avec la mesure de métabolites extracellulaires par implantation conjointe d'une sonde de microdialyse (Zimmer et al 2002). L'association de la microdialyse permet la mesure a posteriori de la concentration de sérotonine extracellulaire. Or, le modèle d'occupation des récepteurs (Seeman et al. 1989; revue par Laruelle 2000) prévoit un lien direct entre les paramètres de fixation in vivo d'un traceur et la concentration extracellulaire en neurotransmetteur. En effet, si le traceur et le neurotransmetteur ont des affinités d'association comparables pour une même cible (ici les récepteurs sérotoninergiques 5HT_{1A}), il va s'établir une compétition entre les deux espèces pour l'association à la cible. Nous avons ainsi montré qu'il était possible de manipuler pharmacologiquement le système sérotoninergique et de suivre dynamiquement et quantitativement ces manipulations par la mesure de la fixation du ^{18}F -MPPF à l'aide de la sonde SIC. Nous avons réalisé la compétition par ordre de difficulté croissante, tout d'abord par injection du traceur non marqué en excès (on parle de traceur « froid »), puis par injection de WAY un antagoniste des récepteurs 5HT_{1A}, et enfin par la compétition par libération de sérotonine déclenchée par injection de fenfluramine. Comme présenté sur la figure 14, l'injection de fenfluramine se traduit d'une part, par l'augmentation attendue de sérotonine extracellulaire mesurée par microdialyse et, d'autre part, par une diminution du marquage au ^{18}F -MPPF mesuré par SIC.

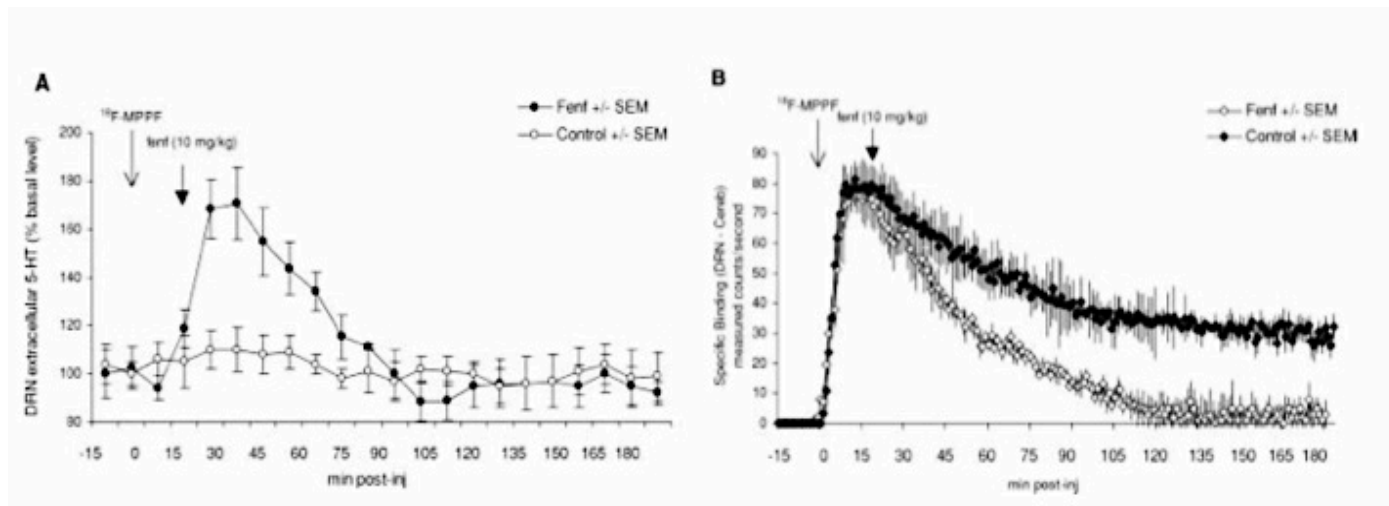


Figure 14. Validation des études de fixation compétitive pour le ^{18}F -MPPF dans le noyau raphé dorsal (NRD). A) Mesure de la concentration de sérotonine extracellulaire par une sonde de microdialyse en condition contrôlée et après injection de fenfluramine. B) Mesure simultanée de la fixation spécifique du ^{18}F -MPPF dans le NRD en condition contrôlée et après injection de fenfluramine. Les sondes sont implantées comme indiquée sur la figure 10. (Adapté de Zimmer et al 2002)

La structure cérébrale étudiée était ici le raphé dorsal dont les dimensions sont nettement inférieures à celles du striatum. Cela a imposé les développements méthodologiques décrits au paragraphe 1.5.1 pour corriger des effets de « volume partiel ». Ces données ont constitué le point de départ de nombreuses études menées en particulier par le groupe de Luc Zimmer à Lyon sur ce traceur prometteur (Mauger et al. 2002 ; Rbah et al. 2003; Zimmer et al. 2003; Riad et al. 2004; Aznavour et al. 2006;). En particulier, ces études ont été reprises pour une autre structure cérébrale, l'hippocampe, où l'injection de fenfluramine ou la stimulation physiologique du noyau du raphé conduisent à une diminution significative du marquage (-25 à -90%) (Zimmer et al 2003, Rbah et al 2003). La sonde intracérébrale a donc constitué un élément essentiel dans la validation de ce nouveau traceur in vivo en particulier pour le contrôle et la quantification des effets de différentes manipulations pharmacologiques du système sérotoninergique.

2.2 Etude du métabolisme énergétique cérébral

Le second axe de validation poursuivi avec la sonde intracérébrale SIC a été l'étude du métabolisme énergétique cérébral à l'aide du ^{18}F -FDG. Pour être totalement honnête, ces travaux ont débuté de façon opportuniste, pour dépasser les contraintes pratiques qui entravaient les études pharmacocinétiques décrites au paragraphe précédent. En effet, le ^{18}F -

FDG est de loin le traceur β^+ dont la disponibilité est la mieux garantie dans les centres d'imagerie TEP, car il s'agit d'un traceur utilisé quotidiennement en clinique pour le diagnostique et le suivi thérapeutique des cancers. A l'inverse, les études menées sur le ^{11}C -Raclopride et le ^{18}F -MPPF étaient initialement plus chaotiques puisque la synthèse réussie de ces traceurs était nettement plus hypothétique que celle du ^{18}F -FDG. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Philippe Hantraye (URA2210 CNRS/CEA Service Hospitalier Frédéric Joliot à Orsay), nous avons d'abord utilisé le ^{18}F -FDG comme outil de validation et de calibration de l'instrument puis pour l'étude du métabolisme énergétique du glucose. Au contact de Marie Claude Grégoire, j'ai appris les bases de la modélisation compartimentale. La résolution temporelle élevée de la sonde a permis d'aller au delà de simples mesures cinétiques (courbes activités vs temps) et de fournir des mesures quantitatives des paramètres physiologiques impliqués dans l'accumulation du glucose radio-marqué. Nous avons conduit deux séries d'expériences pour lesquelles des modifications du métabolisme énergétique étaient induites soit par modification pharmacologique du métabolisme mitochondrial soit par une activation sensorielle. Un modèle compartimental du métabolisme du glucose comportant 3 compartiments et 4 constantes cinétiques a été mis en œuvre afin de déterminer les paramètres cinétiques individuels pour chaque animal, ce qui a mis en évidence les variations interindividuelles du métabolisme énergétique. Pour la première série d'expérience nous avons quantifier le métabolisme du glucose après injection dans le striatum de malonate, un inhibiteur du complexe mitochondrial II. Pour la deuxième série d'expériences, nous avons testé la capacité de la sonde intracérébrale à détecter des variations modestes (5-10%) du métabolisme de la consommation du glucose dans le cortex somatosensoriel (C_{ss}), en réponse à une stimulation sensorielle selon le paradigme bien établi de la stimulation mécanique des vibrisses (McCasland & Woolsey 1988; Kossut et al. 1988; Antal & Toldi 1989).

Les protocoles expérimentaux ont également mis en jeu des techniques d'autoradiographie et de mesure du débit par sonde laser doppler à des fin de contrôle et de validation des effets métaboliques induits soit par le malonate soit par la stimulation. Comme présenté sur la figure 15, les études sur le modèle « malonate » ont mis en évidence une diminution de la constante cinétique k_3 (activité de l'hexokinase pour la phosphorylation du glucose) uniquement dans l'hémisphère cérébral lésé, les variations des autres constantes étant non significatives. Ce résultat indique que la diminution de l'accumulation du ^{18}F -FDG dans le striatum lésé est liée à une diminution du métabolisme énergétique et non du nombre de neurones ou à une augmentation de l'activité de la dé-phosphatase (constante k_4).

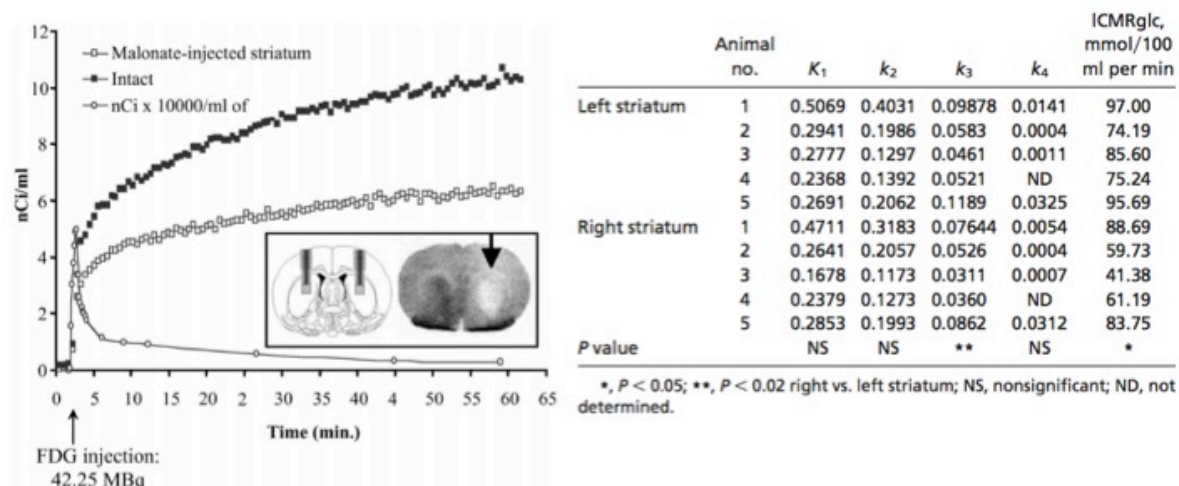


Figure 15. Etude du métabolisme du glucose sur un modèle de lésion métabolique A) Effet du malonate sur le métabolisme énergétique dans le striatum chez le rat anesthésié. L'accumulation du traceur est fortement diminuée dans le striatum lésé. En encart, on montre la localisation des sondes sur une coupe frontal de cerveau de rat (Paxinos et Watson 1998). L'autoradiographie réalisée post mortem montre clairement l'hypofixation du traceur dans le striatum lésé. B) Tableau des constantes cinétiques obtenues pour chaque animal pour les striata lésés (striatum droits) et sains (striatum gauche) et les taux consommation de glucose associés (ICMRgl).

Le second protocole repose sur l'enregistrement de l'accumulation du ^{18}F -FDG successivement en condition « contrôle » où lors de la stimulation sensorielle unilatérale. Une augmentation d'environ 40% du taux local de consommation de glucose calculée à partir des constantes k_1, k_3, k_2 extraites des cinétiques mesurées par les sondes SIC a été mise en évidence (figure 16).

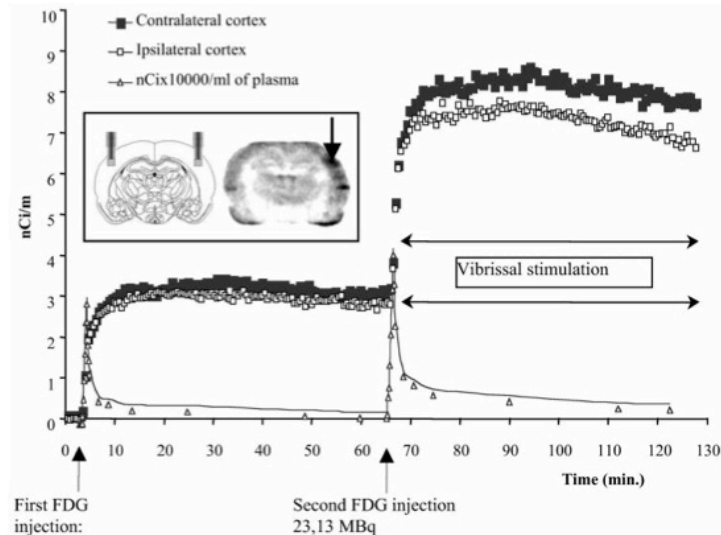


Figure 16. Protocole double injection pour l'étude du métabolisme lors d'une activation sensorielle. Une première injection est réalisée et l'accumulation du traceur est enregistrée pendant 60 minutes en condition de repos puis la stimulation sensorielle unilatérale est mise en œuvre et une deuxième injection est réalisée. En encart, on montre la position des sondes sur une coupe frontale d'atlas de Paxinos et l'autoradiographie qui montre l'hyper fixation du ^{18}F -FDG dans le cortex sensoriel en tonneaux associé aux vibrisses.

2.3 Méthodologie pour la mesure de la fonction d'entrée artérielle

Lors des études du métabolisme énergétique cérébral, la modélisation compartimentale implique de déterminer l'évolution de la concentration du traceur dans le compartiment plasmatique. Cette cinétique appelée « fonction d'entrée » représente le traceur circulant « disponible » pour le système. Cette mesure est loin d'être triviale et constitue encore aujourd'hui un challenge expérimental chez le petit animal, en particulier pour les études sur les modèles murins. Pour les expériences décrites au paragraphe précédent, ces mesures ont été réalisées manuellement par prélèvements sanguins rapides (courbes en triangles blancs sur les figures 15 et 16). Cette technique mobilise deux personnes pendant l'ensemble de l'expérience et ne permet pas d'obtenir une résolution temporelle élevée. Dans ce contexte, j'ai mené avec Laurent Besret (SHFJ URA2210, Orsay) une étude méthodologique visant à étudier la possibilité d'utiliser une sonde SIC de 250 microns de diamètre introduite dans l'artère fémorale du rat anesthésié pour la mesure directe *in situ*. L'enjeu était, d'une part, de permettre une mesure sans prélèvements de sang (les recommandations éthiques et physiologiques indique qu'au maximum 10 % du volume sanguin total peut être prélevé, ce qui limite fortement le nombre de prélèvements chez le rongeur) et, d'autre part, d'obtenir une résolution temporelle élevée assurant une mesure précise de la cinétique, en particulier du pic post injection. Cette

approche s'est révélée extrêmement performante comme le montre la figure 17. Un problème majeur auquel nous avons été cependant confronté est l'importance du bruit γ à 511keV pour une sonde insérée dans l'artère fémorale soit à proximité d'organes comme la vessie, le foie qui accumulent fortement le traceur immédiatement après l'injection. Il a fallu adjoindre une sonde « témoin » placée empiriquement pour prendre en compte ce signal, ce qui alourdi sensiblement le protocole. Ces travaux ont rencontré un écho important dans la communauté de l'imagerie du petit animal par les techniques isotopiques, car ils ont eu lieu simultanément à une prise de conscience de la communauté que la production d'images de haute qualité n'était pas nécessairement en recherche préclinique une finalité en soi, mais que l'information biologique pertinente devait être extraite par la modélisation cinétique (Laforest et al. 2005). Plusieurs solutions alternatives ont été développées comme l'extraction de cinétique à partir d'un voxel cardiaque (Shimoji et al. 2004), ou l'utilisation de compteur externe avec micro-prélèvements (Convert et al. 2007). Une solution élégante pour pallier à la difficulté du placement d'une sonde témoin a été éliminée par l'utilisation d'une beta probe associé à un court-circuit artériovéneux (Weber et al. 2002). En tout état de cause, cet aspect méthodologique des études quantitatives en TEP sur les modèles animaux n'est pas tranché et de nouvelles approches continuent d'être proposées (Yu et al. 2009; Warnock et al. 2011).

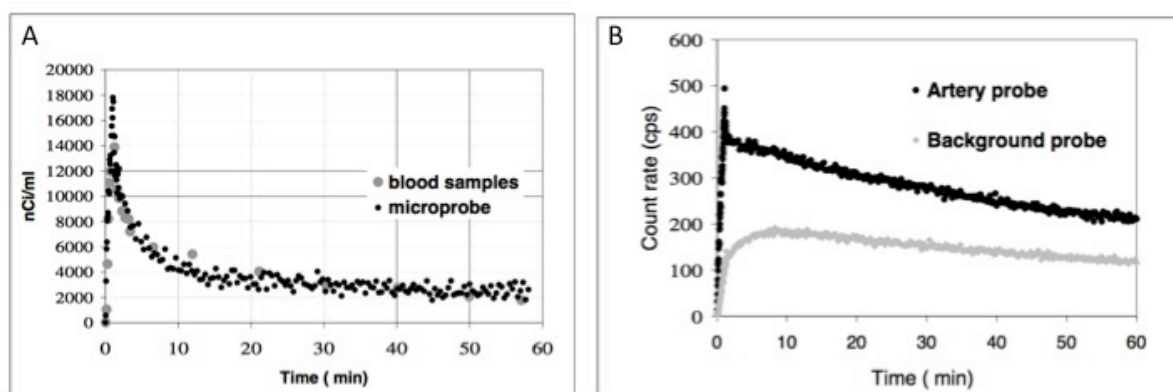


Figure 17. Mesure de la fonction d'entrée artérielle avec la sonde SIC. A) Comparaison entre les données obtenues par la sonde positionnée dans un cathéter dans l'artère fémorale et les prélèvements sanguins réalisés sur l'autre artère fémorale. B) La courbe montrée sur la figure de gauche pour la sonde est obtenue en corrigeant le signal enregistré par la sonde intra-fémorale par celui enregistré par une sonde identique située à l'aplomb de la sonde intra-fémorale.

3 Valorisation

La sonde intracérébrale a été valorisée par un transfert industriel réalisé en 2000-2001. Le dispositif n'avait pas été breveté et a donc fait l'objet d'une licence de savoir faire entre le CNRS et la société Biospace Mesure (Paris). Ce transfert faisait suite à plusieurs contacts de laboratoires de recherche académiques ou privés qui souhaitaient utiliser le détecteur. J'ai participé au transfert, en particulier à l'établissement du cahier des charges techniques et en interagissant avec les ingénieurs de la société (P Asselin, S Maitrejean) pour définir les améliorations à apporter au prototype. L'une d'elle concernait la réalisation d'un dépôt métallique fin sur la sonde pour améliorer son « blindage » à la lumière. En effet notre prototype nécessitait de travailler en lumière atténuée sous peine de collecter les photons ambiants. Plusieurs systèmes ont été rapidement installés dans différents laboratoires, et j'ai participé à l'installation d'un premier système commercial prototype dans les laboratoires Merck de Philadelphie. Il est apparu assez rapidement que la société s'inscrivait dans une logique commerciale et souhaitait vendre le dispositif en réalisant un minimum de développements par rapport au prototype. Au final, la sonde a été installée et utilisée dans une trentaine de laboratoires en Europe, en Asie et aux Etats Unis.

4 Production scientifique

Ces travaux ont donné lieu à 11 publications dans des revues à comité de lecture tant dans des revues d'instrumentation que dans des revues de médecine nucléaire ou de neuroscience. Les études du métabolisme énergétique avec la modélisation du protocole double injection du ¹⁸F-FDG ont été publiées dans la revue PNAS. Les publications en relation avec cette thématique sont listées ci-dessous par ordre chronologique décroissant.

Articles dans des revues à comité de lecture

Pain F, Dhenain M, Gurden H, Routier AL, Lefebvre F, Mastrippolito R, Lanièce P.(2008) *Physics in Medicine and Biolog.*;53, 5385-404.

Desbrée A, Verdurand M, Godart J, Dubois A, Mastrippolito R, **Pain F**, Pinot L, Delzescaux T, Gurden H, Zimmer L Lanièce P (2008) "The potential of the radiosensitive β -microprobe to monitor the [18F]MPPF binding in the mouse hippocampus in vivo" *Journal of Nuclear Medicine*; 49, 1155-61

Desbrée A, Rbah L, Langlois JB, Grenier D, Mastrippolito R, **Pain F**, Pinot L, Lanièce P, Zimmer L, Gurden H. (2007). "Simultaneous in vivo magnetic resonance imaging and radioactive measurements with the β -MicroProbe". *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* ; 34, 1868-72.

Desbrée A, **Pain F**, Gurden H, Pinot L, Grenier D, Zimmer L, Mastrippolito R, Lanièce P (2005) "A new multimodality system for quantitative in vivo studies in small animals: combination of Nuclear Magnetic Resonance and the radiosensitive B-Microprobe. " *IEEE Transactions on Nuclear Science*; 52, 1281-1287.

Desbrée A., **Pain F.**, Gurden H., Zimmer L., Pinot L., Lanièce P., Mastrippolito R. (2004) "New approach in in vivo multimodal small animal imaging combining NMR spectroscopy and a radiosensitive B-Microprobe." *Journal of Neuroscience Methods*; 140, 47-52

Pain F., Lanièce P, Mastrippolito R, Hantraye P, Gervais P, Besret L (2004) "Arterial input function measurement without blood sampling using a B Microprobe in rats." *Journal of Nuclear Medicine* ;45, 1577-1582.

Pain F., Besret L, Vaufrey F, Grégoire MC, Pinot L, Gervais P, Ploux L, Bloch G, Mastrippolito R, Lanièce P, and Hantraye P. (2002) "In vivo quantification of localized neuronal activation and inhibition in the rat brain using a dedicated high temporal resolution B-sensitive microprobe" *PNAS*; 99, 10807-10812.

Zimmer L, Hassoun W, **Pain F.**, Bonnefoi F, Laniece P, Mastrippolito R, Pinot L, Pujol JF, Levie V. (2002) "SIC, an intracerebral $\beta(+)$ -range-sensitive probe for radiopharmacology investigations in small laboratory animals: Binding studies with C-11-raclopride". *Journal of Nuclear Medicine*; 43, 227-233

Zimmer L, **Pain F.**, Mauger G, Plenevaux A, Le Bars D, Mastrippolito R, Pujol JF, Renaud B, and Lanièce P. (2002), "The potential of the B-Microprobe, an intracerebral radiosensitive probe, to monitor the [18F]-MPPF binding in the rat dorsal raphe nucleus," *Eur J Nucl Med* 29, 1237-1247.

Pain F., Lanièce P, Mastrippolito R, Charon Y, Comar D, Levie V, Pujol JF, and Valentin L. (2002) "SIC, an Intracerebral Radiosensitive Probe for in vivo Neuropharmacology Investigations in Small Laboratory Animals: first prototype design characterisation and in vivo evaluation." *IEEE Transactions Nuclear Science*; 49, 822-826

Pain F., Lanièce P, Mastrippolito R, Charon Y, Comar D, Levie V, Pujol JF, and Valentin L. (2000) "SIC, an Intracerebral Radiosensitive Probe for *in vivo* Neuropharmacology Investigations in Small Laboratory Animals: Theoretical Considerations and Physical Characteristics". *IEEE Transactions on Nuclear Science*; 47, 25-32

Chapitre d'ouvrage scientifique

Pain F., Laniece P " New advances in in vivo imaging of small animals " Nupecc Report on Nuclear Science : Impact, Applications, Interactions (2002) eds. D Guerreau, J Aystö

Communications orales

Pain F -invited speaker- (2004) Recent Advances Input Function without Blood Sampling using the β Microprobe. *51st Society for Nuclear Medicine Meeting, Modern Imaging Technology Workshop*

Pain F., Besret L, Desbree A, Gurden H, Mastrippolito R, Lanièce P, Hantraye P. (2003) High temporal resolution blood input function measurement without blood sampling using the β Microprobe in the anaesthetized rat. *High Resolution Molecular Imaging in Small Animals*, Madrid, Spain.

Desbree A, **Pain F.**, Gurden H, Lanièce P, Mastrippolito R (2003) New approach in *in vivo* small animal imaging combining Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and a radiosensitive β microprobe. *High Resolution Molecular Imaging in Small Animals*, Madrid, Spain.

Mastrippolito R, Gurden H, Desbree A, **Pain F.**, Lanièce P. (2003) New instrumental approaches in *in vivo* small animal imaging. *In vivo methods 2003*, Stockholm, Suède.

Desbree A, **Pain F.**, Gurden H, Lanièce P, Mastrippolito R. (2003) New approach in *in vivo* small animal imaging combining Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and a radiosensitive β microprobe. *In Vivo Methods 2003*, Stockholm, Suède.

Pain F., Glatigny A, Guillemin MT, Laniece P, Lefebvre F, Mastrippolito R, Pinot L, Ploux L, Charon Y, Hantraye P, Levie V, Menard L, Tavitian B, Valentin L, Zimmer L. (2001) New detection methods for quantitative *in vivo* analysis of radioligand in small laboratory animals. *International conference on Imaging Technologies in Biomedical Sciences*, Milos, Grèce

Pain F., Laniece P, Mastrippolito R, Charon Y, Comar D, Hantraye P, Levie V, Pinot L, Pujol JF, Valentin L. (2000) New approaches for *in vivo* pharmacological studies on small awake animals. *European Society for Autoradiography 3rd meeting*, Paris, France.

Pain F., Glatigny A, Hantraye P, Lanièce P, Levie V, Mastrippolito R, Pinot L, Ploux L, Valentin L. (2000) New approaches for *in vivo* neuropharmacological investigations of the dopaminergic system in small animals. *Society for Neurosciences 30th annual Meeting*, New Orleans, United States.

Pain F., Lanièce P, Mastrippolito R, Charon Y, Comar D, Hantraye P, Levie V, Pinot L, Pujol JF, Valentin L. (2000) SIC, an intracerebral radiosensitive microprobe for *in vivo* neuropharmacology investigations in small

laboratory animals: First prototype design, characterisation and *in vivo* evaluation. *IEEE Nuclear Symposium and Medical Imaging conference*, Lyon, France.

Communications affichées

A. Desbrée, M. Verdurand, J. Godart, A. Dubois, L. Magnier, R. Mastrippolito, **F. Pain**, L. Pinot, T. Delzescaux, H. Gurden, L. Zimmer, P. Laniece *IEEE Medical Imaging Conference* The potential of the radiosensitive β -MicroProbe to monitor *in vivo* the [18F]MPPF binding in the mouse hippocampus (2008) *Imaging Conference* (Honolulu, USA)

Desbrée, L. Rbah, J. Langlois, D. Grenier, R. Mastrippolito, **F. Pain**, L. Pinot, P. Laniece, L. Zimmer, and H. Gurden A new multimodal and quantitative approach for *in vivo* small animal brain studies : combination of the Nuclear Magnetic Resonance and the radiosensitive B-MicroProbe (2006) *IEEE Medical Imaging Conference* San Diego, USA)

Jan S, A. Desbrée, **F. Pain**, Guez D, C. Comtat, H. Gurden, S. Kerhoas, P. Lanièce, F. Lefebvre, R. Mastrippolito, R. Trebossen (2005) Monte Carlo simulation of the microPET® FOCUS system for small rodents imaging applications *IEEE Nuclear Symposium and Medical Imaging conference*

Desbrée A, JB Langlois, D. Grenier, **F. Pain**, H. Gurden, R. Mastrippolito, L. Pinot, L. Zimmer, P. Laniece (2005). Combining nuclear techniques to nuclear magnetic resonance: simultaneous MRIa / β microprobe *in vivo* analysis of [18F]-MPPF binding in the rat hippocampus . *Association for Molecular Imaging Annual Conference* **F. Pain**, AL. Routier, A. Desbrée, P. Lanièce, H. Gurden, M. Dhenain, R. Mastrippolito (2005) Development and evaluation of a rat brain and whole body voxelised phantoms for Quantitation of radiotracers studies using the B Microprobe. *Association for Molecular Imaging Annual Conference*, Orlando, United States.

Desbrée, P. Laniece, F. Lefebvre, H. Gurden, R. Mastrippolito, and **F. Pain** (2004) Geant4-based simulations of voxelised rat and mouse phantoms: evaluation for quantification in multimodal studies. *Association for Molecular Imaging Annual Conference*, Orlando, United States.

F. Pain, Lefebvre F, Desbrée A, Gurden H, Lanièce P, Mastrippolito R. (2003) Development of a segmented rat brain voxel phantom dedicated to the evaluation and the improvement of radioimagers' performance in small animal studies. *High Resolution Molecular Imaging in Small Animals*, Madrid, Spain.

F. Pain, Besret L, Zimmer L, Lanièce P, Mastrippolito R, Pinot L, Hassoun W, Vaufrey F, Leviel V, Hantraye P, Valentrin L. (2002) The B MICROPROBE : an alternative to PET measurements for small animal studies. *Society for Nuclear Medicine*, Los Angeles, United States.

F. Pain, Besret L, Hassoun W, Gregoire MC, Hantraye P, Lanièce P, Leviel V, Mastrippolito R, Pinot L, Zimmer L, Valentin L. (2001) Evaluation biologiques *in vivo* d'une nouvelle sonde intracérébrale radiosensible B⁺: études pharmacocinétiques du système dopaminergique et mesures quantitative du métabolisme énergétique cérébral chez le rat. 5ème Colloque de la Société des Neurosciences, Toulouse, France.

F. Pain, Besret L, Hassoun W, Laniece P, Mastrippolito R, Pinot L, Hantraye P, Leviel V, Vaufrey F, Zimmer L, Valentin L. (2001) SIC, an intracerebral radiosensitive Microprobe for *in vivo* neuropharmacology investigations in small laboratory animals: First prototype design, characterisation and *in vivo* evaluation. 4ème International conférence on High Resolution PET and single photon Imaging on small Animal, Washington, United States.

Besret L, **F. Pain**, Vaufrey F, Grégoire MC, Bloch G, Ploux L, Leviel V, Pinot L, Mastrippolito R, Laniece P and Hantraye P. (2001) Quantitative and compartmental analysis of [18F]-FDG metabolism in rats during somatosensory activation: a comprehensive study with a new β^+ -sensitive Microprobe. 4ème International conférence on High Resolution PET and single photon Imaging on small Animal, Washington, United States.

F. Pain, Lanièce P, Mastrippolito R, Charon Y, Comar D, Hantraye P, Leviel V, Pinot L, Pujol JF, Valentin L. (1999) SIC, an Intracerebral Radiosensitive Probe for *in vivo* Neuropharmacology investigations in awake small laboratory animals. 2ème conférence "High Resolution PET and single photon Imaging on small Animal, Amsterdam, Nederland.

F. Pain, Charon Y, Cohen Solal M, Glatigny A, Lanièce P, Mastrippolito R, Menard L, Pinot L, Ploux L, Valentin L. (1999) Nouvelles approches pour l'exploration *in vivo* des mécanismes cérébraux chez le rongeur. 4ème Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille France.

Articles de vulgarisation

Pain F (2003) « Le compteur–scanner TOHR et la sonde radiosensible B-Microprobe : deux approches complémentaires pour les études in vivo chez le petit animal. » Club Français des Radiopharmaceutiques, St Nectaire, France.

Pain F Modèles animaux et imagerie. Ecole de physique e2phy 2002 La physique pour la santé : du diagnostic à la thérapie Université Claude Bernard Lyon-1, France

Cozzone P, **Pain F**, Mastrippolito R, Lanièce P, Laugier P, Bridal L, Saied A, Charpak S Dossier "l'imagerie du petit animal" Biofutur N°220 p44-48 Mars 2002

Pain F. (2002) Séminaire Imageries médicales "Techniques, applications Perspectives". IUT Montluçon, France

5 Activité d'encadrements

Dans le cadre de ces activités menées en thèse puis en tant qu'enseignant chercheur à partir de 2002 j'ai encadré plusieurs étudiants depuis le niveau L3 jusqu'au doctorat. L'ensemble des stages encadrés est résumé dans le tableau 4.

Encadrements de stages

Nom	Niveau	Durée	Sujet	Année
Romain Dubris	L3	2 mois	Influence de champs magnétiques sur les performances de différents types de photomultiplicateurs	2002
Aurélie Desbrée	M2	2 mois	Simulation Monte Carlo sous Geant 4 du parcours de positon dans les tissus biologiques en présence d'un champ magnétique	2002
Claude Albaret	L3	2 mois	Evaluation de l'utilisation d'une fibre optique pour la détection in situ de l'émission de bioluminescence	2003
Anne Lise Routier	M1	3 mois	Développement d'un fantôme voxelisé de corps entier de cerveau de rat. Application à la quantification pour la sonde SIC	2004

Tableau 4. Encadrements de stages sur les thématiques instrumentales autour de la β -Microprobe

Encadrement de doctorant

J'ai fortement participé entre 2002 et 2005 à l'encadrement d'Aurélie Desbrée notamment sur les aspects de simulations Monte Carlo et la création d'atlas voxelisés de rongeur pour les simulations Monte Carlo.

Aurélie Desbrée (directeur de thèse P Lanièce) 2002-2005

« Nouvelle approche multimodale et quantitative pour les études in vivo chez le petit animal : Couplage de la β -MicroProbe aux techniques magnétiques et développement de fantômes de rat et de souris voxelisés » soutenue en septembre 2005.

6 Conclusion personnelle de cette étape : conditions du succès des travaux instrumentaux à l'interface physique biologie.

Poursuivre une thématique de recherche en instrumentation pour la biologie n'est pas toujours chose aisée. Au-delà des différences de vocabulaire facilement surmontées, les problématiques des uns et des autres ne se recoupent pas toujours et l'ouverture d'esprit nécessaire à intégrer les concepts n'est pas toujours au rendez-vous tant chez les physiciens que les biologistes. En effet, les collègues physiciens regardent parfois ces travaux comme de l'ingénierie pure, une sorte de science de « seconde zone » et peinent à penser les développements comme un outil au service d'une question fondamentale en neuroscience ou plus généralement en biologie. Les réactions que j'ai rencontrées parmi les collègues physiciens à qui j'ai présenté mes travaux s'échelonnaient ainsi de l'enthousiasme à la condescendance amusée. Ma formation initiale d'ingénieur a certainement contribué à mon goût pour l'instrumentation en tant que discipline de recherche en considérant cependant l'objectif final non comme la mise au point d'un « bel » instrument mais son utilisation proprement dite et la production scientifique qui en découle. Quant aux biologistes, emportés par leurs thématiques et ne voyant d'intérêt que dans l'utilisation du détecteur, ils s'effrayent parfois de sortir des sentiers battus (il existe de mon point de vue dans la communauté des neurobiologistes, des effets de mode prégnants pour certaines approches techniques, qui éclipsent transitoirement d'autres approches tout aussi intéressantes) et ne considèrent pas toujours le travail accompli pour construire, caractériser et valider le détecteur. Par ailleurs, la mise en œuvre d'une technique par un laboratoire considéré comme performant tient parfois lieu de validation pour la communauté, la « preuve par l'exemple » remplaçant un retour parfois nécessaire à la compréhension des sources physiques et physiologiques des signaux enregistrés. Lorsque les objectifs sont définis en commun, le travail à l'interface est cependant extrêmement fécond et riche tant sur le plan scientifique qu'humain. Il implique en effet la mise en commun de connaissances et de savoir faire de personnes issues de formations très diverses autour d'une même problématique. Un point de vue naïf peut ainsi faire vaciller les convictions scientifiques les mieux ancrées et susciter de passionnantes discussions et réalisations.

Une des leçons principales de ces premiers travaux de recherches a été de comprendre la nécessité de définir les objectifs d'un projet à l'interface instrumentation/neurosciences en termes de paramètres biologiques ou clinique à mesurer dont l'intensité, l'extension spatiale ou les constantes de temps fixent les performances à atteindre pour les détecteurs tant en sensibilité

de détection qu'en résolution spatiale ou temporelle. Dans le cas où ces objectifs sont peu clairs, l'inclinaison naturelle de l'instrumentaliste sera de construire un « bel » instrument, au risque de produire un « mouton à 5 pattes » inutilisable et inutilisé. La « plus value » en terme de performances doit par ailleurs passer un seuil subjectif relativement élevé pour qu'une nouvelle approche soit adoptée en tant que complément ou substitut aux approches « gold standard ». Par ailleurs, dans le domaine de l'imagerie biomédicale, la concurrence peut être forte et il est indispensable d'estimer avec justesse le temps de développement pour un détecteur au regard des moyens disponibles tant financiers qu'humains. Ainsi, le développement de la sonde SIC a connu un certain succès scientifique pour avoir su proposer au bon moment une alternative simple aux tomographes TEP. En effet, autour des années 2000, de nombreux laboratoires en physique nucléaire et des particules ont initié la construction de tomographes petits animaux, sur les bases des savoir-faire instrumentaux issus des expériences de physique. Dans de nombreux cas, ces projets n'ont pas abouti du fait d'une connaissance approximative des enjeux biomédicaux et de la compétition avec des laboratoires ayant des moyens nettement supérieurs. Dans ce cas, le talent, l'intuition ne suffisent pas et le nombre de laboratoires développant des tomographes TEP pré-cliniques s'est progressivement restreint à quelques grands groupes de recherche associés à des industriels puissants. Dans ce paysage, la sonde intracérébrale SIC a pu prospérer un temps comme une niche du fait de ses performances et de sa simplicité de mise en œuvre. Du point de vue de la valorisation, le détecteur a été transféré via une licence de savoir faire à la société Biospace, fondée par Georges Charpak. Si ce transfert a permis de répondre à des sollicitations multiples de différents laboratoires auxquelles nous ne pouvions pas répondre, la collaboration avec l'industriel ne s'est pas révélée aussi constructive qu'espéré initialement. Dans une logique de survie tout a fait compréhensible, l'entreprise a en effet entrepris de vendre le détecteur après un minimum de développements supplémentaires, sans réelle plus-value en terme de fiabilité par rapport au prototype de laboratoire. Avec le recul, cette valorisation rapide a permis de proposer le détecteur à un maximum d'utilisateurs, mais, nous a certainement coupé de collaborations intéressantes.

Vers 2005, après la finalisation de mes travaux sur la mesure de la fonction d'entrée chez le rat, j'ai eu le sentiment d'être arrivé au bout d'un cycle dans mes travaux de recherches. Tout en restant dans le domaine de l'imagerie du petit animal, j'ai souhaité orienter mes recherches dans une nouvelle direction. A ce moment, un des sujets « chaud » en imagerie du petit animal était le développement rapide d'imageurs optiques pour la détection transcutanée de cellules tumorales préalablement marquées, en particulier par l'utilisation du gène codant pour la luciférase introduit dans les séquences ADN des cellules implantées aux modèles animaux (C.

H. Contag et al. 1997; Zhang et al. 1999; Sweeney et al. 1999; Rehemtulla et al. 2000; Herschman et al. 2000; J. C. Wu et al. 2001). La luciférase ne fluoresce qu'en présence de son substrat la luciférine qui est injectée par voie systémique lors des expériences réalisées à intervalles de plusieurs jours. La détection des photons de fluorescence permet d'obtenir une estimation de l'évolution de la tumeur et donc de l'efficacité de stratégies thérapeutiques. Ces travaux se sont développés très rapidement sous l'impulsion des groupes de Sanjiv Sam Gambhir et de Christopher Contag qui a très rapidement proposé un imageur commercial via la société Xenogen devenue depuis IVIS. La simplicité de mise en œuvre des dispositifs (une simple caméra CCD sensible et de faible bruit dans une boîte noire) et l'intérêt de la modalité pour la recherche pré-clinique en oncologie ont immédiatement déclenché de nombreux travaux de recherches en imagerie optique in vivo. Dans un premier temps, j'ai alors pensé proposer une version optique de la sonde SIC pour la détection des traceurs optiques. Cependant, après des tests préliminaires lors du stage de Claude Albaret en 2003 alors en L3 à Orsay, il apparaissait clairement que les avantages de la sonde radiosensible par rapport aux tomographes TEP n'étaient pas transposables à l'imagerie optique. En premier lieu, les imageurs optiques étaient déjà simples de mise en œuvre et peu coûteux et, la « légèreté » instrumentale de la sonde n'était donc plus dans cette problématique un réel atout. Par ailleurs, les applications précliniques étaient avant tout des applications de localisation et d'estimation du volume des tumeurs, la résolution temporelle n'était donc plus un paramètre essentiel. L'enjeu était plutôt l'imagerie en parallèle de plusieurs animaux sur un même dispositif pour un criblage rapide de traceurs ou l'évaluation parallèle de différents traitements. Enfin, la mesure locale in situ semblait peu adaptée elle était sensible à l'hétérogénéité importante des tumeurs et son champ limité ne permettait pas d'évaluer la présence de cellules tumorales (métastases par exemple) hors du site initial d'implantation des cellules.

Pourtant, la simplicité de mise en œuvre des méthodes optiques et la diversité des sources de contrastes tant endogènes qu'exogènes m'incitait à aller dans cette direction. L'arrivée de Hiram Gurden au laboratoire, neurobiologiste recruté au CNRS a permis de cristalliser cette volonté sur un projet d'imagerie optique in vivo en champ large. Dans un premier temps, l'intérêt commun que nous avons identifié était l'étude du métabolisme énergétique cérébral, dans la continuité de ses travaux post doctoraux pour Hiram Gurden et de mes études in vivo avec la sonde SIC (cf. paragraphe 2-2). La technique d'étude utilisée par Hiram lors de son post doctorat était la cartographie 2D par imagerie optique des signaux hémodynamiques, appelée imagerie optique du signal intrinsèque (IOSI). Le modèle d'activation cérébrale mis en œuvre étant l'activation sensorielle du bulbe olfactif, nous avons tout naturellement tenté l'enregistrement

avec la sonde SIC de l'accumulation du ^{18}F -FDG lors d'une stimulation olfactive. La dimension des structures cérébrales étudiées (100 μm) et les faibles variations absolues des signaux isotopiques attendus constituaient cependant des limites pour l'application de la technique. Ce travail préliminaire nous a cependant permis d'établir un langage commun et, pour ma part, de mieux cerner les enjeux des études du métabolisme sur le modèle de l'activation du bulbe olfactif et l'intérêt des techniques optiques de cartographie à large champ pour l'étude de large populations neuronales en interaction. Nous avons alors initié ensemble au laboratoire IMNC alors en cours de création en 2005-2006, une nouvelle thématique en imagerie optique pour l'étude du métabolisme énergétique cérébral.

Partie II Imagerie optique in vivo en champ large

Dans cette seconde partie du document, je présenterai mes travaux en imagerie optique initiés à partir de 2005 et leurs prolongements actuels. Dans un premier temps, je présenterai les questions biologiques qui ont motivé ces travaux ainsi que le modèle d'activation physiologique que nous utilisons et qui constitue l'une des originalités de ces travaux. Dans un second temps, je détaillerai comment nous avons pu au sein du laboratoire construire un ensemble cohérent de techniques et d'outils d'imagerie optique in vivo pour l'étude de l'activation du bulbe olfactif. Ces développements initiaux ont été rendus possibles par la collaboration avec un neurobiologiste (H Gurden) avec lequel j'ai co-encadré la thèse de Barbara l'Heureux. Enfin, je présenterai le prolongement de ces travaux en imagerie multimodale dans le cadre de la thèse de Rémi Renaud que je dirige actuellement.

1 Contexte des développements en imagerie optique in vivo

Les développements instrumentaux que nous avons réalisés en imagerie optique in vivo avaient pour objectif de construire les outils adaptés en résolution spatio-temporelle à l'étude du métabolisme énergétique cérébral dans le contexte du codage de stimuli olfactifs, en particulier pour permettre la cartographie à l'échelle des structures fonctionnelles pour différents contrastes optiques. Je vais maintenant présenter les questions biologiques qui ont motivées ces travaux.

1.1 Questions autour du métabolisme énergétique cérébral

Bien que le cerveau ne représente qu'un faible pourcentage de la masse corporelle (~2%), il consomme une grande partie de l'énergie disponible, environ 20% (Iadecola 2004). Une question essentielle de la neurophysiologie reste sans réponse : comment les réseaux cérébraux, constamment sollicités pour la transmission et le stockage de l'information dans des aires spécifiques, puisent l'énergie nécessaire pour assurer leurs fonctions ?

En conditions physiologiques, les neurones d'un cerveau adulte consomment exclusivement du glucose apporté avec l'oxygène par le sang. A partir de ces deux molécules, une monnaie énergétique est synthétisée dans le compartiment intracellulaire : l'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP est produite majoritairement dans les mitochondries par les cascades de réactions dans le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire et, pour une faible part, dans le

cytoplasme. Le cerveau ne possède pas de réserves énergétiques, excepté un peu de glycogène dans les cellules astrocytaires. De plus, les cellules ne s'échangent pas d'ATP entre elles pour répondre à leurs besoins. Si on considère que plusieurs milliers de cellules sont sollicitées simultanément dans un réseau donné, le problème du budget énergétique devient crucial à résoudre pour assurer le bon fonctionnement cérébral.

L'étude des mécanismes de la régulation énergétique et la neuroimagerie sont étroitement liés. En effet, neurobiologistes et physiciens ont participé conjointement à l'essor des techniques d'imagerie neuro-fonctionnelle, en particulier la TEP associée au ^{18}F -FDG, l'Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf) en contraste Blood Oxygen Level Dependant (BOLD) et plus récemment les techniques optiques comme la spectroscopie en proche infra rouge (« NIRS » en anglais) ou Imagerie Optique du Signal Intrinsèque (IOSI). Ces techniques sont basées sur la détection de signaux cérébraux d'origine métabolique et vasculaire dont le glucose radio-marqué, l'état d'oxygénation de l'hémoglobine ou la variation locale du volume sanguin. Si elles ont démontré une valeur clinique indiscutable, les bases cellulaires et moléculaires des signaux métaboliques observés restent encore débattues. Quel est le compartiment vasculaire à l'origine du contraste IRMf BOLD, quelles voies cellulaires servent à déclencher ce signal ?

En ce qui concerne le compartiment vasculaire mis en œuvre, une étude a montré la corrélation anatomique des zones activées (au sens du contraste BOLD) avec le réseau capillaire (Harrison et al. 2002). Concernant les bases cellulaires, une étude fondatrice en IRMf-BOLD a montré que ce signal était étroitement corrélé aux potentiels de champ locaux issus des interactions entre les fibres excitatrices afférentes et les cellules post-synaptiques. Les décharges électriques au niveau des cellules ne semblaient pas directement liées au signal (Logothetis et al. 2001). Une étude multimodale associant électrophysiologie et mesure du débit sanguin par sonde laser doppler a confirmé ces résultats en montrant que la suppression des décharges au niveau cellulaire n'abolit pas l'augmentation du débit sanguin lors d'une stimulation des voies afférentes du cervelet (Thomsen et al. 2004). L'existence d'un « jeu à trois » impliquant les neurones, les vaisseaux sanguins, et les cellules gliales (astrocytes) lors d'une activation cérébrale a été étudiée dans le bulbe olfactif par H. Gurden durant son post doc (Gurden et al. 2006). Par des manipulations pharmacologiques *in vivo* associées à la cartographie des signaux optiques IOSI, il a montré que les signaux hémodynamiques enregistrés étaient déclenchés par des processus impliquant la recapture de glutamate, processus qui ont lieu au niveau pré-

synaptique contrairement à l'hypothèse initiale d'un signal IOSI miroir de l'activité excitatrice post-synaptique (Bonhoeffer & Grinvald 1991).

Même si l'existence d'un couplage neuro-métabolique semble évidente, des questions restent ouvertes : Comment varient les paramètres métaboliques et vasculaires pendant l'activation des réseaux? Quelles sont les clefs moléculaires et cellulaires des voies de signalisation pour les échanges énergétiques ? Les problématiques biologiques des études que nous avons menées pour l'étude du métabolisme énergétique cérébral sont ainsi résumées sur la figure 18 qui montre la nécessité de l'étude des mécanismes de couplage entre les neurones et les astrocytes d'une part et entre les astrocytes et les vaisseaux sanguins d'autre part pour l'interprétation des signaux enregistrés en imagerie neuro-fonctionnelle. Ces questions ont constitué le cadre de travail initial de l'équipe Métabolisme Imagerie Olfaction au sein de laquelle mon rôle a été de développer les instruments et méthodologie d'imagerie optiques adapté à la cartographie spatiotemporelle in vivo des signaux fonctionnels .

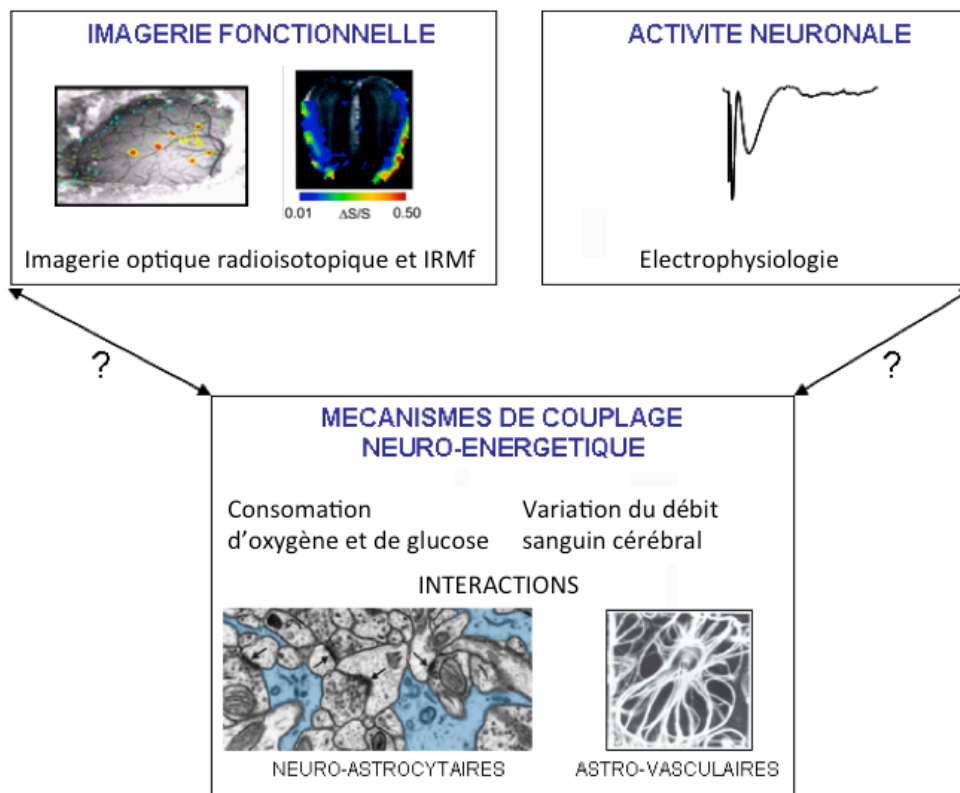


Figure 18. Cadre de travail des activités en imagerie optique pour l'étude du métabolisme énergétique. La compréhension du lien entre les signaux métaboliques et les signaux neuronaux implique d'élucider les mécanismes de coupages neuroastrocytaire et astro-vasculaires

1.2 Quel modèle de l'activation cérébrale ?

L'intégration sensorielle est l'exemple type de représentation cérébrale de l'information. Une représentation spatio-temporelle de l'information est construite à partir de stimuli sensoriels multiples qui peuvent intervenir simultanément et être de natures différentes. Pour les systèmes sensoriels, la correspondance spatiale entre le signal sensoriel et la structure cérébrale est particulièrement marquée. On parle alors de « somatotopie » qui intervient dès les récepteurs des signaux physicochimiques et se conserve jusqu'aux cortex sensoriels. Un stimulus sensoriel est codé sous forme d'une activité cérébrale distribuée spatialement et éventuellement temporellement dans le cortex sensoriel correspondant.

Les différents systèmes sensoriels sont les systèmes visuel, tactile, auditif, olfactif et gustatif. La cartographie de l'activité sensorielle et les règles de codage des stimuli ont été successivement étudiées par différentes modalités comme les techniques auto-radiographiques pour cartographier la consommation de glucose, l'imagerie IRMf BOLD pour l'imagerie tridimensionnelle des variations des paramètres hémodynamiques, l'électrophysiologie, la spectroscopie et l'imagerie optique avec les mesures du débit sanguin par vélocimétrie laser doppler ou la cartographie spatiotemporelle des variations hémodynamiques par imagerie du signal intrinsèque. Parmi les structures sensorielles cérébrales, les plus étudiées sont probablement le cortex visuel, les structures somatosensorielles de la représentation de la patte, le cortex à tonneaux de représentation des vibrisses et la représentation des odeurs au niveau du bulbe olfactif. Le cortex à tonneaux et le bulbe olfactif se distinguent des autres structures sensorielles par des structures fonctionnelles qui sont bien définies anatomiquement et offrent l'avantage de pouvoir être stimulées physiologiquement respectivement par déplacement d'une ou plusieurs vibrisses à une amplitude et une fréquence contrôlée (Axelrad et al. 1976) et par la présentation d'une odeur pour une durée et à une concentration ajustable (Kauer 1974; Kauer & G M Shepherd 1975).

Je vais maintenant décrire schématiquement l'organisation du système olfactif qui est le système que nous avons choisi comme modèle. Le système olfactif principal chez le mammifère peut être décrit sous la forme de trois étages anatomo-fonctionnels : la muqueuse olfactive, le bulbe olfactif (BO), et le cortex piriforme. La muqueuse est l'étage de détection, le BO celui du premier codage et traitement du stimulus, le cortex est l'étage de mémorisation et d'association des informations olfactives aux autres informations comme les entrées sensorielles ou émotionnelles. Chez le rat, 1000 gènes codent pour 1000 récepteurs différents, et chaque neurone olfactif n'exprime qu'un seul récepteur olfactif (Mombaerts 1999) comme

illustré sur la figure 19. Une molécule odorante active une combinaison de récepteurs différents qui reconnaissent des odotopes, des fonctions chimiques caractéristiques de la molécule odorantes. On distingue les fonctions primaires (alcool, ester, acides, cétones...) et secondaires (longueur de la chaîne carbonée, position de la double liaison...) (Uchida et al. 2000).

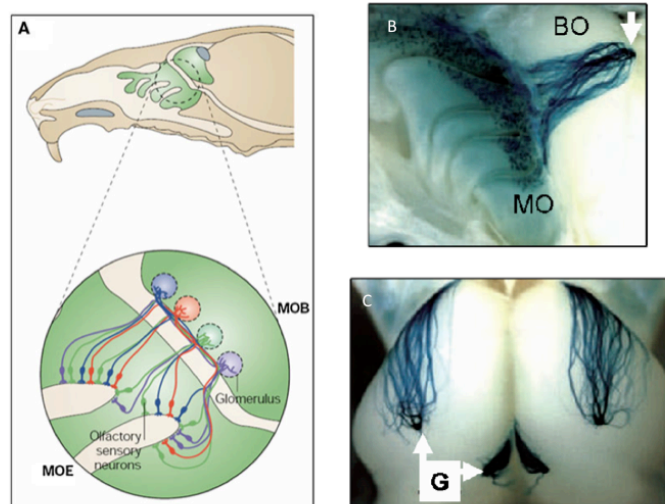


Figure 19. Organisation de la muqueuse et du bulbe olfactif. A) coupe sagittale de tête de rat. En vert on observe le système olfactif principal composé de la muqueuse olfactive (MO) et du bulbe olfactif (BO) B) coupe présentant dans un même plan la MO et le BO chez une souris exprimant le gène rapporteur lacZ, un gène codant pour une protéine introduit derrière le gène codant pour un récepteur olfactif identifié M71. On observe que toutes les fibres marquées (donc exprimant M71) sont réparties dans la muqueuse et convergent vers un glomérule unique dans le bulbe C) Même souris qu'en B avec une image en vue aérienne qui montre les projections symétriques dans les deux hémisphères pour les neurones exprimant le récepteur M71. (Adapté de Feinstein & Peter Mombaerts 2004)

D'un point de vue cellulaire le bulbe olfactif est constitué de couches parfaitement identifiées présentées sur la figure 20 :

- 1 - La couche du nerf olfactif (ONL) qui est constituée des fibres afférentes issues de la muqueuse.
- 2 - La couche glomérulaire (GL) qui est un ensemble de contacts synaptiques entre les terminaisons des neurones récepteurs et les cellules relais (mitrales et cellules à panache) ainsi que les cellules periglomérulaires (PGC).
- 3 - La couche plexiforme externe (EPL) contient les corps cellulaires des cellules à panaches et les dendrites des cellules à panaches, mitrales et granulaires.
- 4 - La couche des cellules mitrales (MCL) contient les cellules principales du bulbe. Elles relaient l'information vers le cortex piriforme.

5 - La couche des cellules granulaires qui contient les corps cellulaires des interneurones.

Les glomérules forment les modules fonctionnels d'entrée du BO et sont les structures dont l'activation est cartographiée en imagerie optique en large champ. Un glomérule est un neuropile individualisé et sphérique avec un diamètre moyen de 100 μm chez le rat. Il est le lieu de convergence de plusieurs milliers de terminaisons axonales provenant d'une population de neurones sensoriels de la muqueuse portant le même récepteur. C'est dans cette couche, où se trouvent de nombreuses synapses tripartites associant neurones, astrocytes et capillaires sanguins que vont se former les cartes spatiotemporelles spécifiques de l'odeur et reproductibles d'un animal à l'autre.

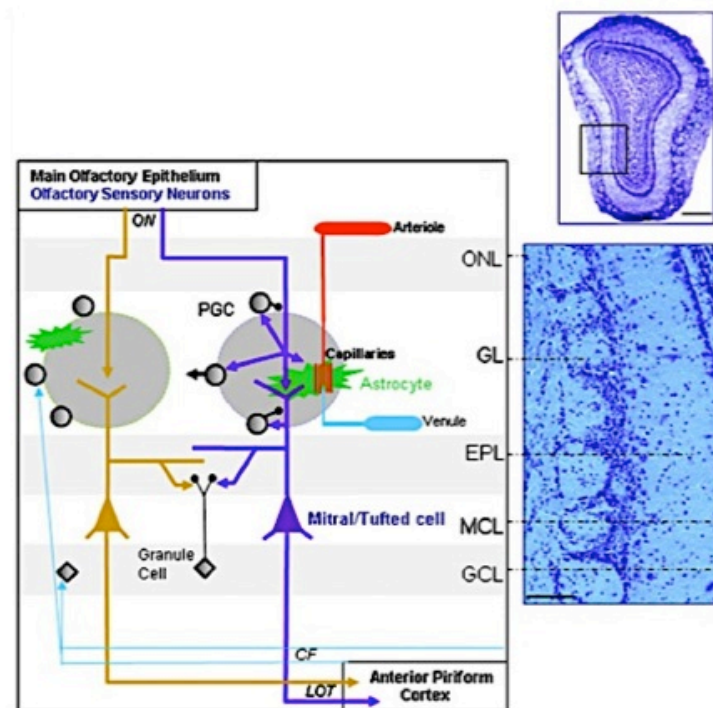


Figure 20. Organisation cellulaire dans le bulbe olfactif. Organisation des différentes couches dans le bulbe olfactif et correspondance anatomique sur une coupe frontale du bulbe (coloration morphologique au crésyl violet). ONL Olfactory Nerve Layer ; GL Glomerular Layer ; EPL External Plexiform Layer, MCL Mitral Cell Layer, GCL Granular Cell Layer, LOT Lateral Olfactory Tractus (Adaptée de Pain et al 2011)

L'activation sensorielle du bulbe olfactif constitue un modèle de choix pour l'étude du métabolisme énergétique cérébral par imagerie optique. En effet, les structures qui réalisent la première étape du codage olfactif, les glomérules, sont de véritables usines métaboliques puisqu'ils concentrent un nombre important de synapses et sont irrigués par un réseau dense

de capillaires sanguins (Chaigneau et al. 2003). Les glomérules sont clairement délimités anatomiquement par les astrocytes et entourés par les cellules juxta glomérulaires (interneurones constitués de différents types cellulaires). De façon particulièrement intéressante, chaque odeur active une combinaison de glomérules spécifiques en fonction de sa nature chimique et de sa concentration. On observe pour chaque stimulation, une carte d'activation spécifique de la ou des molécules odorantes et de l'intensité de la stimulation sensorielle. Enfin, les glomérules sont localisés dans les 200 premiers micromètres sous la surface, dans une position superficielle particulièrement favorable aux techniques d'imagerie optique pour lesquelles la profondeur d'imagerie est limitée par l'absorption et la diffusion des photons par les tissus. Ce caractère superficiel permet (i) d'envisager des interventions pharmacologiques du système étudié par simples applications topiques et (ii) autorise l'imagerie au travers de l'os dans d'excellentes conditions physiologiques des tissus.

2 Imagerie optique en champ large : imagerie de réflectance et imagerie de l'autofluorescence

Comme je l'ai indiqué en préambule à ce chapitre, les premières études que nous avons menées lors de l'arrivée de Hiram Gurden au laboratoire ont été des études avec la sonde intracérébrale que nous tentions de positionner au dessus d'une zone glomérulaire activée lors d'une stimulation réalisée en continu après l'injection de ^{18}F -FDG. La faible résolution spatiale de la technique et le fait qu'elle fournissait non pas une cartographie mais une mesure ponctuelle de l'accumulation de glucose constituait cependant un handicap majeur, renforcé par l'impossibilité de répéter et/ou varier les stimulations durant l'expérience. J'ai alors décidé de réorienter mes activités instrumentales vers l'imagerie optique en champ large. Pour situer ces développements parmi les techniques disponibles, le graphe de la figure 21 montre les domaines d'applications en fonction des performances en résolution spatiale et temporelle des principales techniques fonctionnelles *in vivo*. Les imageries isotopiques et magnétiques permettent l'imagerie fonctionnelle en trois dimensions avec des résolutions de l'ordre du mm et de la seconde. Les techniques invasives s'appuient sur la mesure *in situ*, après implantation d'une sonde ou une électrode. L'électrophysiologie fournit une résolution à l'échelle cellulaire mais cette approche est limitée pour la cartographie. Enfin, les différentes approches en imagerie optique couvrent un vaste domaine de résolutions spatiales et temporelles. La résolution cellulaire est accessible en microscopie bi-photonique mais sur un champ de vue restreint. L'imagerie IOSI fournit des cartographies de l'ensemble de la structure étudiée mais avec une

résolution à l'échelle des structures fonctionnelles (les glomérules pour le bulbe). Après des tâtonnements pour utiliser la sonde SIC comme détecteur de fluorescence, mes projets en imagerie optique ont peu à peu muri. J'ai entrepris le développement d'un imageur optique en champ large, car la résolution spatio-temporelle et le champ de vue proposé étaient les mieux adaptés à la cartographie de l'activation spatiotemporelle sur l'ensemble du bulbe. Par ailleurs cette approche permettait d'envisager à court terme, avec un investissement financier raisonnable, la réalisation d'un imageur multimodal associant plusieurs modalités d'imagerie optique adaptées à l'étude du coupage neuro-énergétique.

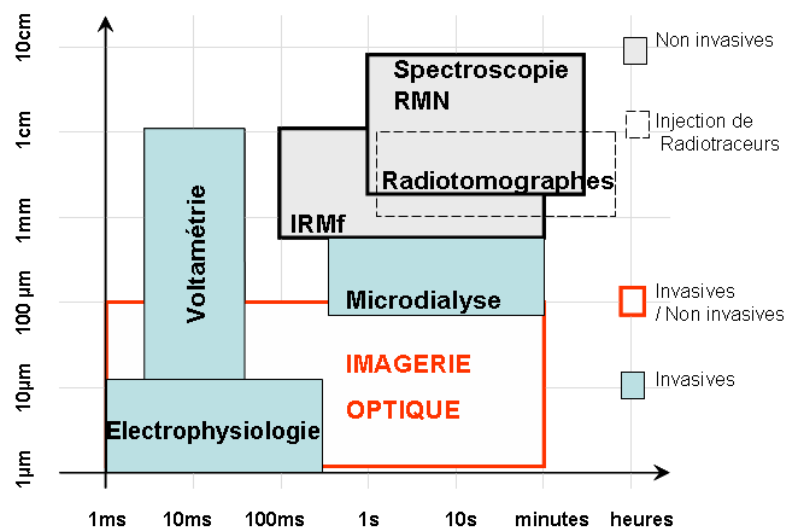


Figure 21. Principales modalités pour les études de l'activation fonctionnelle cérébrale in vivo.

2.1 Principe de l'imagerie optique du signal intrinsèque

La première modalité que nous avons développée est l'imagerie du signal optique de réflectance généralement désignée sous le nom d'Imagerie Optique du Signal Intrinsèque (IOSI). Cette technique développée dans les années 1990 pour l'étude du cortex visuel chez le primate (Grinvald et al. 1991), repose sur la modification des propriétés optiques des tissus biologiques provoquée par une variation locale et transitoire de l'état d'oxygénation du sang, du débit et du volume sanguin, lors d'une activation cérébrale. Pour la compréhension des mécanismes cellulaires sous-jacents aux signaux enregistrés par les techniques d'imagerie fonctionnelles cliniques, l'IOSI est particulièrement adaptée puisque ces changements enregistrés dans le compartiment vasculaire sont également à l'origine des signaux d'IRMf-BOLD clinique. Pour

la lumière visible et en proche infra-rouge, les tissus sont des milieux à la fois très diffusants et très absorbants. Il existe une gamme spectrale entre 600 et 900 nm où la pénétration de la lumière dans les tissus est maximale, de plusieurs millimètres à un centimètre ou plus.

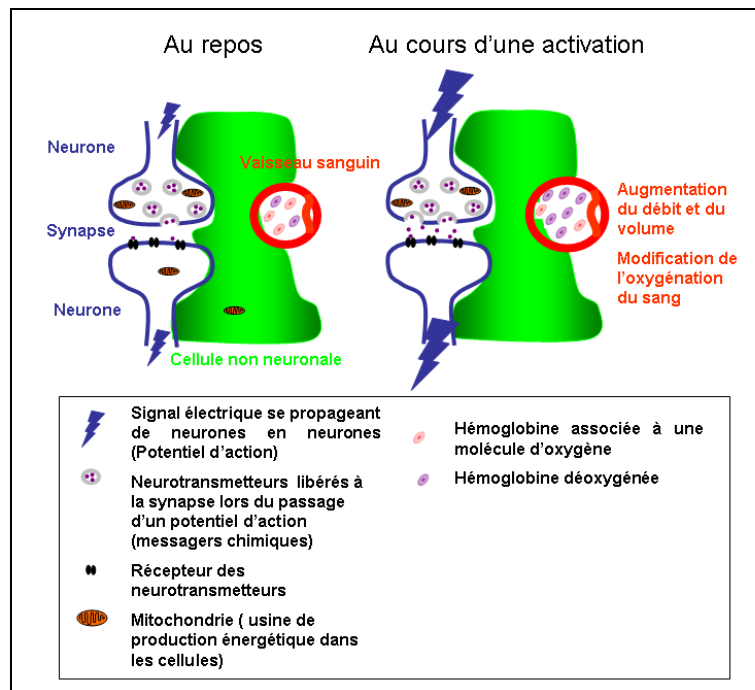


Figure 22 Source du signal en Imagerie Optique du Signal Intrinsèque. A la suite d'une activation cérébrale, la demande énergétique locale est modifiée afin de permettre la transmission de l'information. Cela se traduit localement par des modifications hémodynamiques, en particulier des augmentations transitoires du volume sanguin local, du débit sanguin et du niveau de saturation en oxygène.

Lors d'une activation cérébrale, les facteurs susceptibles de modifier l'absorption sont, d'une part, un changement transitoire du volume sanguin local, et, d'autre part, une modification du ratio entre l'hémoglobine oxygénée et l'hémoglobine de-oxygénée (figure 22). En effet, les spectres d'absorption de l'hémoglobine associée ou non à une molécule de dioxygène sont distincts (figure 23 A). En illumination en lumière verte (473 nm), une diminution de la proportion d'hémoglobine oxygénée se traduit par une diminution de l'absorption par les tissus. A l'inverse, en lumière rouge (610 nm), une diminution de la proportion d'hémoglobine oxygénée se traduira par une augmentation de l'absorption. Les effets conjoints d'augmentation du volume et des changements de l'oxygénation se combinent pour former le signal intrinsèque qui signe une activation locale des tissus cérébraux. En théorie, on peut distinguer les effets d'augmentation du volume des effets des variations de l'oxygénation en réalisant des enregistrements à au moins deux longueurs d'onde. Comme on le voit sur la figure 3, pour une illumination dans le jaune (à 570 nm), l'imagerie n'est sensible qu'au changement de volume

sanguin et pas aux variations de l'oxygénation car à cette longueur d'onde, l'absorption des photons est identique pour l'hémoglobine oxygénée ou désoxygénée. Pour enregistrer majoritairement le signal lié aux modifications de l'oxygénation, on se place généralement dans le orange-rouge autour de 580-630 nm où l'absorption est faible (ce qui permet une bonne pénétration dans les tissus), mais où la différence entre l'absorption des formes oxygénée et désoxygénée reste importante.

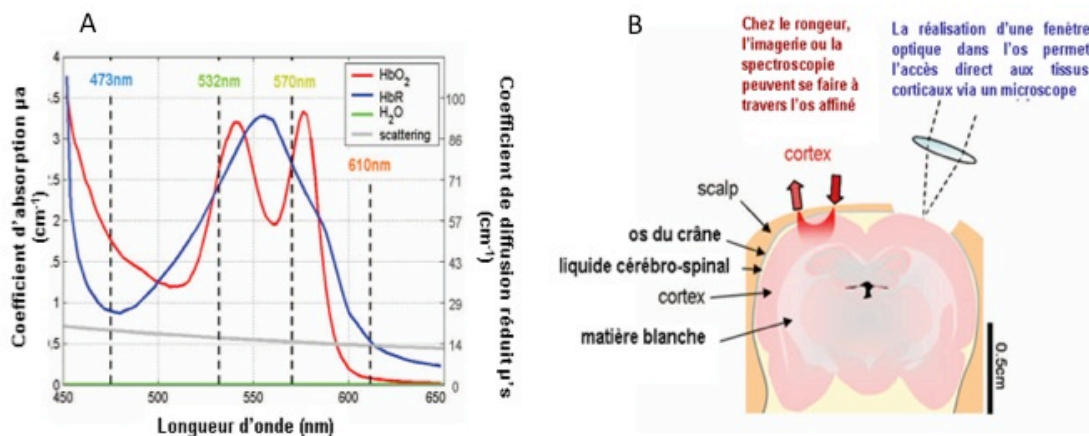


Figure 23 Propriétés optiques des tissus et implication en IOSI. A) Coefficient d'absorption et de diffusion des tissus cérébraux en fonction de la longueur d'onde. En rouge, absorption de l'hémoglobine oxygénée HbO_2 , en bleu absorption de l'hémoglobine désoxygénée HbR , en vert absorption par l'eau (lecture sur l'axe des ordonnées de gauche). En gris, diffusion des tissus (à lire sur l'axe des ordonnées de droite). B) Schéma de principe de l'imagerie optique en champs large chez le rongeur (figures adaptées Hillman 2007).

2.2 Principe de l'imagerie d'autofluorescence.

L'enregistrement des signaux de fluorescence endogènes pour l'étude du métabolisme énergétique cellulaire a été proposé dès les années 60 par Britton Chance un pionnier majeur de l'imagerie optique in vivo (Chance et al. 1962). Avec l'avènement de caméras Charge Coupled Device (CCD) sensibles, de source d'illumination et de filtre optiques interférentiels, la technique, initialement restreinte à la spectroscopie avec une résolution spatiale très grossière, est devenue une technique d'imagerie qui permet la cartographie avec une résolution spatiale adaptée à l'échelle des unités métaboliques (pour nous les glomérules). Si les travaux initiaux se sont focalisés sur la fluorescence du NAD(P)H , les travaux récents (Shibuki et al. 2003; Murakami et al. 2004; Reinert et al. 2011) ont montrés l'intérêt de l'imagerie de la fluorescence d'un autre intermédiaire métabolique, les flavoprotéines. Contrairement au NAD(P)H qui est localisé dans les mitochondries *et* dans le cytoplasme, les flavoprotéines sont présentes uniquement dans les mitochondries, ce qui élimine l'ambiguïté sur le compartiment

cellulaire à l'origine des variations de fluorescence. Les signaux sont plus rapides que les signaux hémodynamiques (IOSI) et permettent en principe d'atteindre une meilleure résolution temporelle, le maximum de réponse de fluorescence étant atteint dans les premières centaines de millisecondes suivant la stimulation pour l'autofluorescence des flavoprotéines. Le déroulement temporel des signaux d'autofluorescence (AF) est cependant complexe et encore mal compris. Les signaux observés après activation sont bi-phasiques et constitués pour le NADH d'une phase rapide de diminution de fluorescence suivie d'une augmentation lente de la fluorescence avant retour à l'état basal. Le déroulement temporel de la fluorescence des flavoprotéines est identique mais les signaux sont inversés avec une phase « lumineuse » rapide suivie d'une phase « sombre » lente.

2.3 Dispositifs d'enregistrements construits au laboratoire

Les signaux optiques intrinsèques enregistrés sont des signaux faibles puisque les variations attendues pour des stimulations odorantes dans des conditions physiologiques sont de l'ordre de 0,1 à 1 % pour le signal intrinsèque de réflectance (Rubin & Katz 1999) et de l'ordre de 1% à 10% pour les signaux d'AF (Shibuki et al. 2003; Tohmi et al. 2006). Il faut noter que ces techniques ne fournissent pas des valeurs quantitatives absolues, les signaux à déterminer étant les variations relatives de réflectance ou de fluorescence. Leur faible amplitude impose l'utilisation de capteurs sensibles à bas bruit et qui possèdent une grande dynamique. Afin d'augmenter le rapport signal sur bruit, dans la plupart des protocoles d'étude du métabolisme énergétique cérébral, des enregistrements sont répétés et moyennés pour des conditions de stimulations identiques. Le protocole que nous avons suivi consiste à enregistrer les images de réflectance ou de fluorescence durant 1 minute subdivisée en 3 phases. Une première phase « témoin » d'environ 10s, une seconde phase où la stimulation olfactive est présentée (3 à 10 s), enfin une phase post-stimulation où on enregistre le retour progressif à l'état basal. Pour le bulbe les conditions expérimentales en IOSI sont plus favorables que pour les autres structures cérébrales puisque que les signaux sont d'un ordre de grandeur plus intenses (Rubin & Katz 1999). Cela permet de construire des cartes d'activation à partir d'un enregistrement unique ce qui constitue un avantage unique de ce modèle.

Dans ce cadre, la stabilité des différents éléments du dispositif d'enregistrement, la sensibilité du système à des variations faibles et la reproductibilité des stimuli sont des points essentiels.

Le premier dispositif que nous avons développé au laboratoire dans le cadre du stage de M1 de Djamila Bouargua s'est appuyé sur un objectif macroscopique (Optem) associé à une

caméra de vision industrielle standard (8 bits, non refroidie) afin d'obtenir rapidement nos premières données en imagerie du signal de réflectance malgré des conditions non optimales. Ces premières études m'ont permis de « rentrer » dans le domaine et de développer (i) un dispositif de stimulation olfactive contrôlé et (ii) les protocoles d'analyse d'image pour obtenir les cartes d'activation. Durant la thèse de Barbara L'Heureux (2006-2009), le financement ANR « Astroгло » obtenu en collaboration avec l'équipe de Christian Giaume (Collège de France) et celle de Gilles Bonvento (URA2210 SHFJ) nous a permis de développer un système ayant des performances optimisées (figure 24).

Le photo-détecteur retenu est une caméra CCD 12bits refroidie qui possède un capteur de sensibilité optimisée pour les longueurs d'ondes autour du bleu vert (pour l'enregistrement de l'autofluorescence des flavoprotéines, cf. figure 25.A) (Hamamatsu CCD interligne ORCA AG). La dynamique de la caméra est de 2250:1 ce qui permet de détecter des variations relatives inférieures à 1 pour 2000 sur chaque pixel. La caméra possède un capteur de 1300 par 1000 pixels carrés de 6,5 micromètres de côté. Ces pixels peuvent être regroupés à l'acquisition (binning) ce qui augmente la sensibilité et la rapidité des acquisitions au détriment de la résolution spatiale. En IOSI, nous avons travaillé en résolution spatiale maximale pour une résolution temporelle de 5-10 images par s. En AF, la faiblesse des flux de photons de fluorescence a imposé de travailler en binning 4 par 4 pour une résolution temporelle identique à celle de l'IOSI.

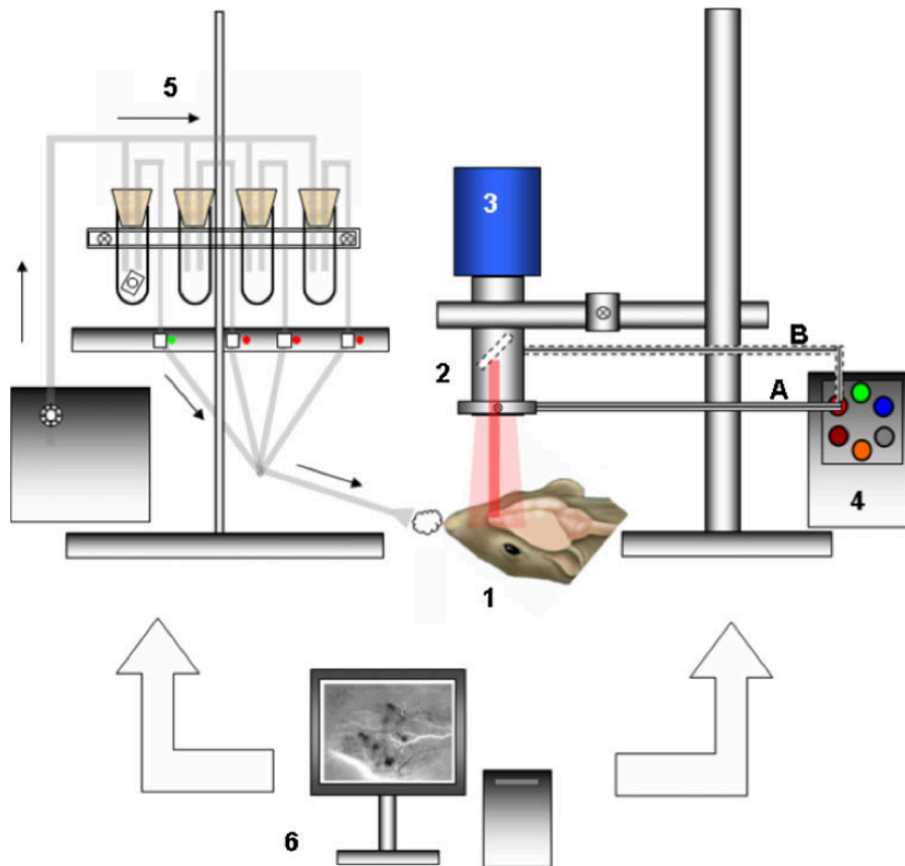


Figure 24. Dispositif expérimental pour les enregistrements in vivo en IOSI et AF. (1) Animal anesthésié sur lequel on a pratiqué une craniotomie pour exposer une partie des tissus du bulbe olfactif. (2) Stéréomicroscope de fluorescence (MZ16 FLIII). (3) Caméra CCD refroidie (4) Source d'illumination associée à une roue à filtre motorisée. (5) Olfactomètre. Chaque fiole peut contenir un papier absorbant imbibé d'une odeur plus ou moins diluée. Un compresseur associé à un manomètre d'entrée permettent de maintenir le système sous une pression contrôlée et des électrovannes vont laisser ou non d'odeur en direction d'un masque situé devant l'animal (6) PC de synchronisation et d'acquisition. A l'issue d'une séquence de stimulation, le film de l'activation est calculé (Adapté de Pain et al 2011)

Un stéréomicroscope (Leica MZF16) configuré pour l'imagerie de fluorescence en épi-illumination a été mis en œuvre. Il possède un objectif plan-apochromatique adapté aux études in vivo ($\times 1$, ouverture numérique 0,15, distance de travail 55mm). Pour l'illumination homogène et stable des tissus, après avoir testé une approche par couronnes de LED ou par un éclairage fibré en Y, la solution optimale est l'utilisation d'une source thermo-régulée et stabilisée (Tungsten-halogène QHTC Lot Oriol) associée à un anneau fibré fixé autour de l'objectif du microscope. Pour l'AF, une source métal Halide (EL6000 Leica) qui possède un spectre plus intense dans les longueurs d'onde d'excitation des fluorophores étudiés (350-450nm) a été utilisée via le port d'épi-illumination du microscope. Des images typiques pour les longueurs d'onde d'intérêt sont montrées sur la figure 25B. Les bandes spectrales utilisées

sont fixées à l'aide de filtres interférentiels passe-bande de largeur spectrale de 10-15nm. Le champ image est de l'ordre de 4 par 3 mm pour un grossissement usuel autour de $\times 4$. La profondeur de champ image est ajustable via un diaphragme et a été étudiée pour les différentes conditions d'enregistrements (figure 25 C). Elle se situe autour de 500 microns en IOSI et de 1mm en AF. Le stimulateur olfactif utilisé est une adaptation d'un système de perfusion (Automate perfusion) qui est associé à un compresseur. Il délivre via un système d'électrovannes pilotables une stimulation contrôlée en durée. Le contrôle de l'intensité de la stimulation est réalisé par une dilution plus ou moins importante de l'odeur pure dans de l'huile minérale le mélange étant déposé sur un papier absorbant. La reproductibilité des stimulations en durée et intensité a été caractérisée à l'aide d'un dispositif à ionisation de flamme (figure 25D).

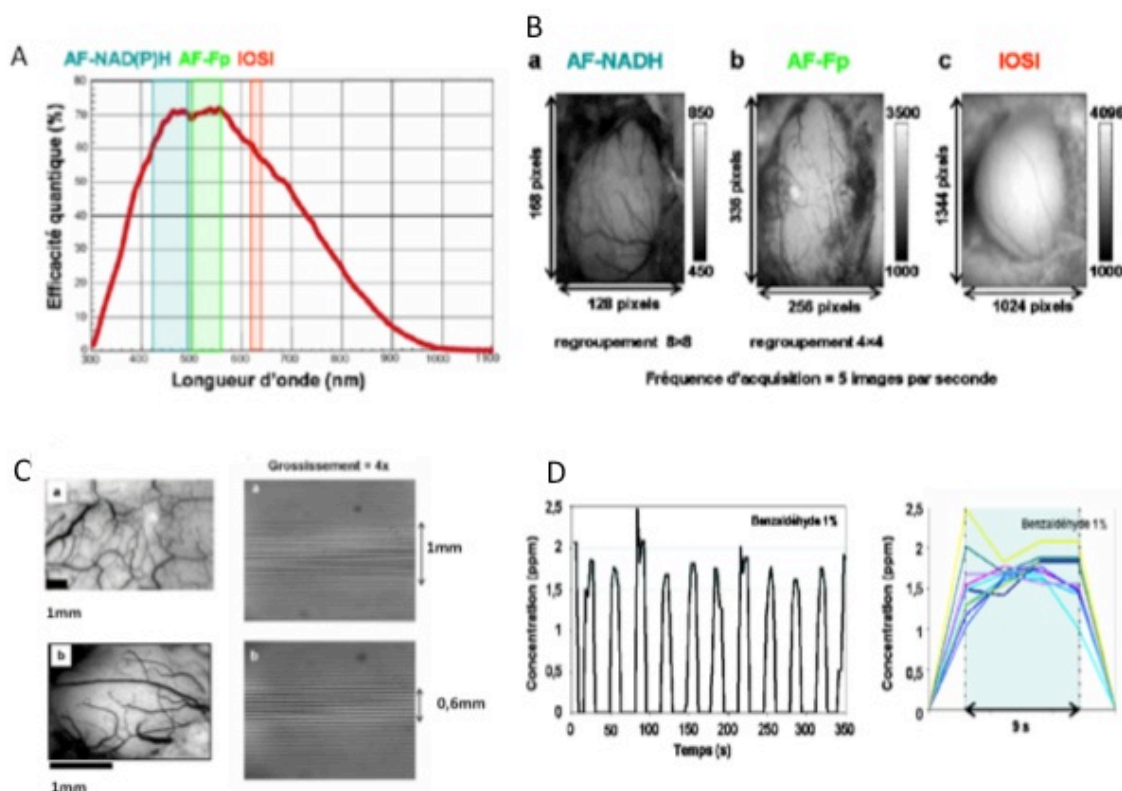


Figure 25. Performances globales du dispositif d'imagerie pour l'IOSI et l'AF.

A) Efficacité quantique du capteur de la caméra CCD ORCA AG et bandes spectrales utilisées pour l'IOSI et l'AF. B) Champ de vue du dispositif et dynamiques des images basales pour (a) l'autofluorescence du NADH, (b) des flavoprotéines et (c) à réflectance intrinsèque à 630nm. C) Mesure de la profondeur de champ pour le diaphragme utilisé en AF (haut) et IOSI (bas) et images associées. D) Vérification par ionisation de flamme de la reproductibilité en intensité et durée des stimulations olfactives. (Thèse de Barbara L'Heureux, 2009)

Les différents éléments du dispositif sont interfacés et synchronisés via un logiciel unique. Un logiciel de traitement d'image associé au programme d'acquisition a été programmé en C++

/Qt afin de pouvoir disposer d'une visualisation à la fin de chaque séquence de la carte des signaux relatifs d'IOSI ou d'AF à la fin d'un enregistrement.

En 2009, à l'issue de la thèse de Barbara L'Heureux, nous disposions d'un système capable de mesurer les signaux d'imagerie intrinsèque (d'origine vasculaire) et les signaux d'autofluorescence (d'origine cellulaire) sur un même animal lors de stimulations successives. L'étape suivante était naturellement l'utilisation des dispositifs en routine dans le cadre de travaux en neurosciences. Ce système a été mis en œuvre pour (i) caractériser les premières mesures des signaux d'AF lors d'une activation in vivo dans le bulbe olfactif, et (ii) étudier des souris génétiquement modifiées par KO pour la connexine 30 une protéine impliquée dans la communication entre les astrocytes.

2.4 Méthodologie pour l'analyse des signaux d'AF

Les enregistrements des signaux d'autofluorescence in vivo dans le bulbe olfactif n'avaient pas encore jamais été abordés quand nous avons entrepris ces travaux dans le cadre de la thèse de Barbara L'Heureux. Parallèlement à la construction du dispositif d'imagerie, nous avons développé des simulations Monte Carlo des signaux d'autofluorescence. Les objectifs de ces simulations étaient (i) de déterminer la faisabilité des enregistrements in vivo des signaux d'AF du NADH et des flavoprotéines (ii) d'analyser l'origine des signaux enregistrés (iii) de comparer les signaux disponibles en terme d'intensité dans le BO et dans le cortex somato-sensoriel (Css).

Au delà de l'implémentation de l'algorithme de propagation des photons dans les tissus en géométrie multicouches (Wang et al. 1995), une partie importante du travail a été la constitution de modèles multicouches du Css et du BO sur la base de données anatomiques et fonctionnelles (figure 26). Nous nous sommes appuyés sur l'anatomie des structures étudiées (Woolsey et al. 1996; Petersen 2003) ; une revue des données de la littérature en particulier les concentrations locales en hémoglobine ; les propriétés de diffusions des tissus évaluées in vitro et l'estimation des concentrations des fluorophores endogènes (Yaroslavsky et al. 2002; Nawroth et al. 2007; Chaigneau et al. 2003). Les simulations ont été réalisées selon trois étapes : dans un premier temps l'excitation de la fluorescence endogène en calculant les matrices tridimensionnelles des densités de photons absorbés pour les deux géométries et pour les longueurs d'ondes d'excitation du NADH et des flavoprotéines. Dans une seconde étape , ces matrices ont

constitué les sources d'émission de fluorescence et nous avons estimé les images de fluorescence associées pour une colonne corticale ou un glomérule activé. Enfin, nous avons étudié l'influence de variations du volume sanguin (estimée entre 5% et 30 % localement lors d'une activation du Ccs et du BO) sur les signaux d'AF détectés. Les différences importantes des propriétés anatomiques (épaisseurs et nature des couches tissulaires, densité de capillaires sanguins) et optiques ont conduit a des résultats sensiblement différents pour l'imagerie des signaux AF dans le BO et le Ccs comme cela est résumé sur la figure 27 .

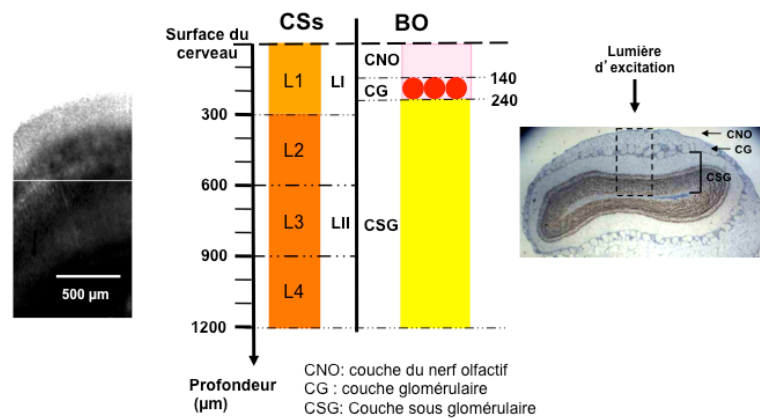


Figure 26. Modèles anatomo-optiques du cortex somato-sensoriel (Ccs) et du bulbe olfactif (BO).

CNO L1-L4 couches anatomiques du cortex. LI-LII couches anatomo-optiques. couche du nerf olfactif, CG couche glomérulaire, CGF couche sous glomérulaire

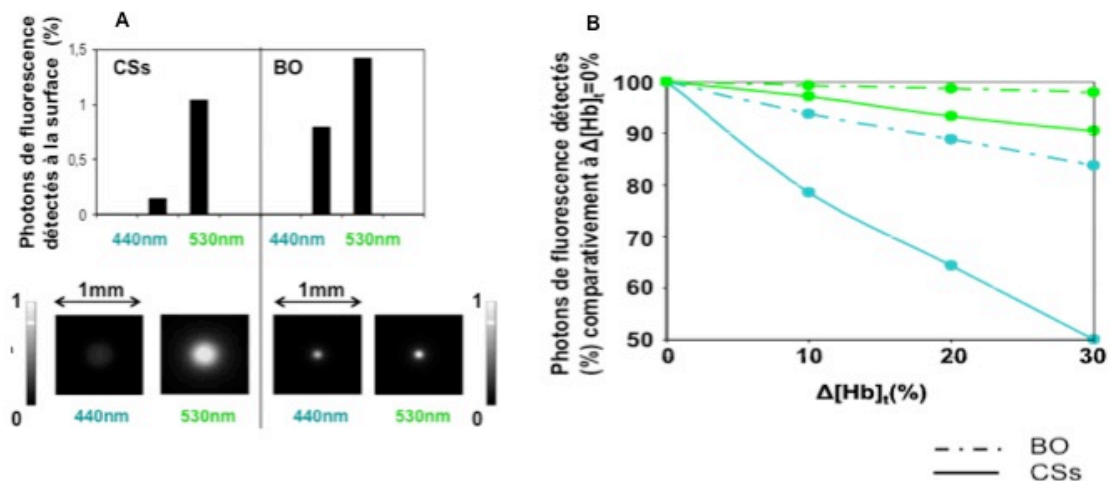


Figure 27. Simulations des signaux d'AF pour l'activation une colonne corticale ou d'un glomérule. A) Intensité normalisé des signaux de fluorescence du NADH (440 nm) et des flavoprotéines (530nm) détectés pour le Ccs et le BO. Images correspondantes pour une colonne corticale ou un glomérule. B) Influence des variations du volume sanguin local sur les signaux d'AF.

De façon surprenante, les signaux de fluorescence attendus pour le bulbe olfactif sont d'intensité comparable à celle des signaux obtenus pour le cortex somatosensoriel. En effet, bien que les structures fonctionnelles activées sont a priori nettement moins profondes dans le bulbe, la couche supérieure du bulbe est constituée de nerfs et est extrêmement diffusante. On note cependant que les signaux d'AF du NADH sont beaucoup plus facilement accessibles dans le bulbe que dans le cortex ce que nous avons vérifié expérimentalement par la suite (figure 27 A). Enfin, les simulations ont montré que les signaux d'AF sont moins affectés par les effets hémodynamiques dans le bulbe que dans le cortex et que les signaux des flavoprotéines sont moins absorbés que ceux du NADH (figure 27 B). En conséquence, ce sont ces signaux que nous avons visés pour les enregistrements dans le BO (L'Heureux et al 2009).

2.5 Enregistrements in vivo avec le dispositif

2.5.1 Enregistrements en IOSI sur les Cx30-KO

Pour comprendre le rôle fonctionnel de la communication inter-astrocytaire, nous avons utilisé dans les études menées dans le cadre de l'ANR « Astroflo » des souris déficientes en connexine 30 (Cx30), protéine transmembranaire qui est constitutive de jonctions communicantes entre astrocytes. Les souris Cx30-KO présentent un défaut de connectivité astrocytaire d'environ 30% (collaboration G. Bonvento URA2210 SHF et C. Giaume, thèse de Lisa Roux Collège de France). En l'absence de souris de type sauvage pour l'étude comparative des signaux d'IOSI chez la souris Cx30-KO, c'est la souche C57BL6 qui a constitué la souche de référence. Cette souche est la plus appropriée car elle correspond au fond génétique à partir duquel les Cx30-KO ont été obtenues. Un exemple des cartes d'activation que nous avons obtenues avec ces souris en IOSI pour différentes intensités de stimuli sont présentées sur la figure 28.

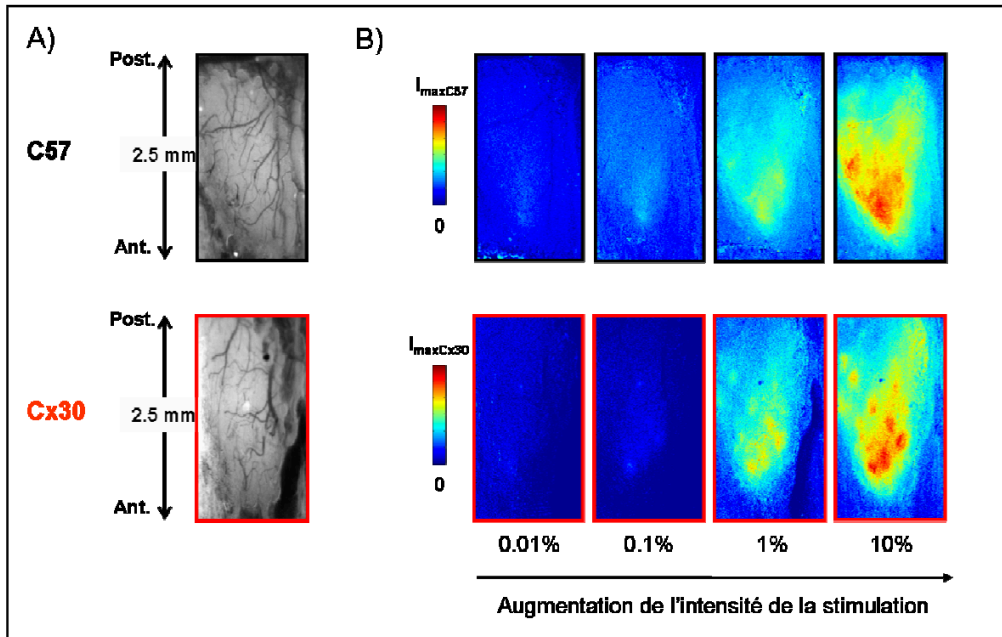


Figure 28. Carte des variations du signal intrinsèque pour les souris C57BL6 et les souris Cx30-KO pour des stimulations d'intensité croissante.

Pour résumer brièvement les résultats obtenus, trois observations ont été établies : (i) pour les deux types de souris, la dynamique temporelle et l'amplitude des signaux temporels étaient identiques quelque soit l'intensité de la stimulation ; (ii) l'activité focale (c'est à dire les zones d'activité la plus intense) a une extension spatiale comparable pour les deux types de souris mais le nombre de zones focales activées distinctes (glomérules ou groupe de glomérules) est plus important chez le Cx30-KO ; (iii) pour une zone focale donnée, la réponse vasculaire est plus locale chez les Cx30-KO, l'extension spatiale de la zone activée étant moins importante localement. Ce dernier point est cohérent avec le rôle des astrocytes dans le couplage neurovasculaire (Gurden et al. 2006; Petzold et al. 2008; Petzold & Murthy 2011), en particulier pour le contrôle du débit sanguin au niveau des capillaires. Une diminution du couplage astrocyte-astrocyte pourrait alors conduire à des modifications hémodynamiques plus localisées.

L'augmentation du nombre de zones focales activées chez les Cx30-KO a été confirmée par imagerie auto-radiographique au 14C-2-Deoxyglucose (2DG) (données non publiées Claire Martin IMNC). Les études comportementales menées dans un protocole « Go-NoGo » au laboratoire n'ont cependant pas montré de différences de comportement entre les souris Cox30 Ko et la souche témoin C57BL6 (données non publiées Claire Martin). L'ensemble de ces résultats très intéressants n'a pas encore été publié car une étude complémentaire est en cours

de réalisation sur des souris KO pour un autre type de connexine également impliquées dans le couplage astrocytaire, les connexines 43.

2.5.2 Premiers enregistrements des signaux d'AF dans le bulbe olfactif

Nous avons enregistré et analysé les premiers signaux d'AF des flavoprotéines *in vivo* lors d'une activation sensorielle du BO. Ce travail, initié par Barbara L'Heureux pour les études en aigu, a été poursuivi par Romain Chery durant sa thèse (2009-2012) pour les études chroniques au travers d'une fenêtre optique. Ces développements ont fait l'objet d'une publication méthodologique (Romain Chery et al. 2011). Nous avons pu enregistrer sur un même animal les signaux IOSI et d'AF lors de deux stimulations successives. Les signaux AF présentent une intensité importante souvent supérieure à 1%, même pour des stimulations modérées. Le déroulement temporel de ces signaux est particulièrement complexe. Il est composé d'une première phase « lumineuse » courte qui survient dans la première seconde qui suit la stimulation et dure environ 2 à 3 s. Une seconde phase « sombre » intervient alors et dure plusieurs dizaines de secondes avec un retour lent à la ligne de base. Ces résultats sont résumés sur la figure 29. Au signal AF se superposent (i) l'effet du photo-blanchiment et (ii) l'effet des signaux hémodynamiques concomitants. En effet, l'augmentation locale du volume sanguin dans les secondes qui suivent la stimulation se traduit par une absorption accrue de la fluorescence. La mise en œuvre de techniques de correction pour ces effets est délicate *in vivo* car le photo-blanchiment et les effets hémodynamiques varient au cours d'une session d'imagerie avec l'état physiologique de l'animal anesthésié. Nous avons réalisé des ajustements exponentiel et bi-exponentiel de la cinétique du photo-blanchiment. Il est apparu (i) que le photo-blanchiment n'était pas homogène sur l'ensemble du plan image et (ii) que la constante de temps de photo-blanchiment variait fortement au cours de la session d'imagerie. Au final, la stratégie retenue a été de soustraire un essai « à blanc » (sans stimulation), image par image, à la séquence d'imagerie enregistrée lors d'une stimulation olfactive tel que cela est proposé pour l'imagerie calcique *in vivo* (Wachowiak et Fletcher 2010).

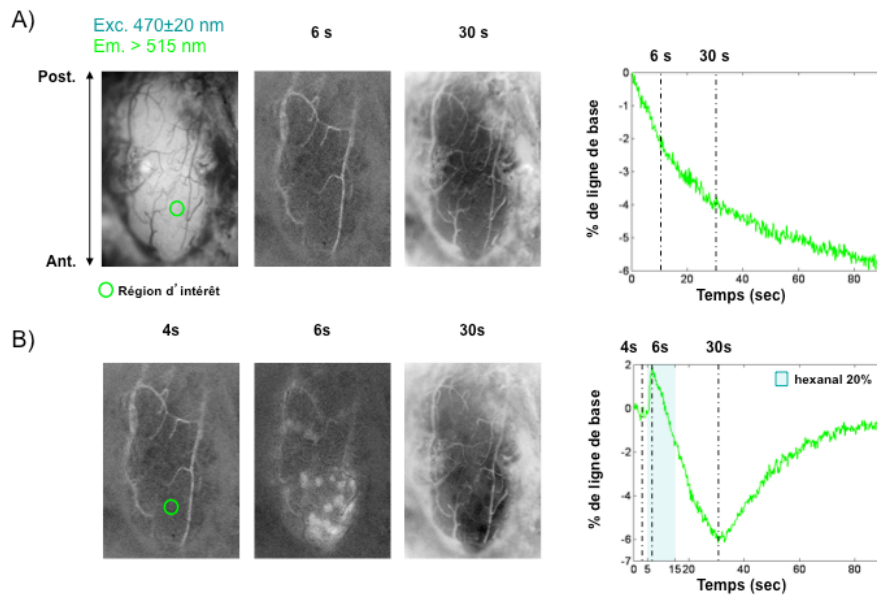


Figure 29 Caractéristiques des signaux d'AF dans le BO. A) effet de Photo-blanchiment in vivo : Carte du signal d'AF à différents instants sans stimulation. B) Signaux biphasiques observés lors d'un enregistrement avec stimulation.

Les simulations MC ont montré que l'influence des effets hémodynamiques sur les signaux d'AF des flavoprotéines dans le bulbe était limitée. Cependant les effets d'absorption sont inhomogènes sur l'ensemble du champ image du fait de zones plus ou moins vascularisées et doivent donc être pris en compte. La correction des effets d'absorption du sang sur la fluorescence est un problème qui a suscité de nombreuses études depuis les années 70, pour estimer précisément le déroulement temporel des signaux de fluorescence. Une abondante littérature existe pour ce problème, qui est souvent crucial pour la quantification des signaux in vivo de fluorescence endogène ou exogène (Bradley & Thorniley 2006). Parmi plusieurs approches, une technique consisterait à enregistrer les signaux de réflectance aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence au cours de la même stimulation. Ces enregistrements nécessitent un dispositif multimodal capable d'enregistrer non plus séquentiellement mais au cours d'une même stimulation les signaux de réflectance et les signaux de fluorescence. Ce dispositif est en cours de construction au laboratoire et sera présenté au paragraphe 3.3 .

En conclusion, cette étude exploratoire des signaux d'AF a permis de montrer que les signaux d'autofluorescence dans le BO sont cohérents avec les signaux enregistrés dans le C_{ss}. Ce sont des signaux plus rapides que les signaux hémodynamiques, donc a priori plus proches des signaux cellulaires. Les cartographies obtenues en considérant le signal AF dans une fenêtre temporelle d'1s après la stimulation sont semblables à celles obtenues pour les signaux hémodynamiques. Il arrive cependant que des glomérules activés soient masqués en AF par

l'absorption de la fluorescence par les artérioles proches. L'un des enseignements majeurs de ces travaux est que des signaux d'imagerie enregistrés avec la même modalité peuvent être différents d'une structure cérébrale à l'autre. Les différences anatomo-physiologiques doivent être pris compte lors de la comparaison des signaux entre différentes structures (cortex sensoriels) et espèces (rat et souris) sur les signaux. Dans ce contexte, l'outil de simulation Monte Carlo est susceptible d'apporter des informations utiles permettant d'expliquer les différences en intensité et résolution spatiale observées pour les mêmes signaux enregistrés dans des structures différentes (Tian et al. 2011).

Pour aller au-delà de ces premiers développements, plusieurs chemins étaient également intéressants, le premier consistait à développer l'imagerie in vivo à l'échelle cellulaire, via notamment les microscopies non linéaires. Deux écueils fondamentaux nous ont dans un premier temps détournés de cette option : en premier lieu, les compétences dont nous disposions au laboratoire étaient éloignées de l'imagerie bi-photonique in vivo qui est une technique relativement complexe, en second lieu, ces travaux sont déjà menés avec succès en France et à l'étranger pour l'étude du bulbe olfactif (on peut entre autres citer le groupe de Matt Wachowiak aux états unis, le groupe de Serge Charpak en France). Le second chemin consistait à creuser plus profondément le sillon de l'imagerie en champ large en proposant de nouveaux paradigmes d'acquisition et en raffinant les méthodes d'analyse pour proposer des cartographies quantitatives des paramètres hémodynamiques et de l'oxygénation des tissus. Dans ce contexte, j'ai initié, avec le soutien financier du programme Bonus Qualité Recherche de l'Université Paris Sud, le développement de l'imagerie IOSI multi spectrale. L'objectif est de dépasser la simple mesure des variations d'intensité relatives de la lumière réfléchiée en quantifiant les variations des paramètres hémodynamiques via la modélisation des variations de réflectance enregistrées à plusieurs longueurs d'onde.

3 Imagerie multispectrale du signal intrinsèque

3.1 Principe

L'imagerie intrinsèque multispectrale consiste à acquérir lors d'une même stimulation, des images de la réflectance des tissus illuminés à différentes longueurs d'onde. La Loi de Beer-Lambert simple décrit en spectrophotométrie l'atténuation d'un faisceau lumineux traversant un échantillon absorbant, quelque soit la longueur d'onde considérée. $I(x)$ est l'intensité du

faisceau après traversée d'un échantillon d'épaisseur x . I_o est l'intensité initiale, μ est le coefficient d'atténuation de l'échantillon qui est lié à l'absorption des photons par le milieu traversé et dépend de la longueur d'onde.

$$I(x) = I_o \exp^{-\mu \times x} \quad \text{Eq (1)}$$

Pour les objets absorbants et diffusants comme les tissus biologiques, le parcours des photons n'est plus rectiligne et la prise en compte de la diffusion impose une version corrigée de cette loi, afin de tenir compte des variations de parcours en fonction de la longueur d'onde. On parle alors de loi de Beer-Lambert modifiée, introduisant le « chemin différentiel » (differential pathlength ou « DP »).

$$I_\lambda(x) = I_{o,\lambda} \exp^{-\mu \times DP_\lambda} \quad \text{Eq (2)}$$

La Loi de Beer-Lambert modifiée a été largement utilisée dans le cadre des études d'oxymétrie par spectroscopie NIRS, développées à partir de la fin des années 80. Ces techniques très développées au Japon et au Royaume Uni, y compris au niveau clinique, constituent des alternatives intéressantes pour les mesures du niveau d'oxygénation tissulaire, en particulier pour les études chez le nouveau né lorsque l'imagerie IRM est difficilement réalisable (pour revue on se référera à Elwell et al. 1993; Lloyd-Fox et al. 2010). Dans ce contexte, l'enregistrement de la lumière transmise d'un point à l'autre du cerveau se fait à l'aide d'un casque d'optodes et permet l'obtention d'images 2D (topographie de diffusion optique) ou 3D (tomographie de diffusion optique). L'obtention des données oxymétriques nécessite des enregistrements à au moins deux longueurs d'onde puisque, aux longueurs d'onde visibles, deux chromophores absorbants majeurs doivent être considérés : l'oxyhémoglobine et la déoxyhémoglobine (figure 23). On peut alors calculer pour chaque longueur d'onde la réflectance en fonction du temps définie par :

$$\begin{aligned} \Delta R_{\lambda_1}(t) &= -\log\left(\frac{I(t)}{I_o}\right) = \left(\varepsilon_{HbO_2,\lambda_1} \Delta c_{HbO_2}(t) + \varepsilon_{Hbr,\lambda_1} \Delta c_{Hbr}(t)\right) \times DP_{\lambda_1}(t) \\ \Delta R_{\lambda_2}(t) &= -\log\left(\frac{I(t)}{I_o}\right) = \left(\varepsilon_{HbO_2,\lambda_2} \Delta c_{HbO_2}(t) + \varepsilon_{Hbr,\lambda_2} \Delta c_{Hbr}(t)\right) \times DP_{\lambda_2}(t) \end{aligned} \quad \text{Eq (3)}$$

En enregistrant les variations de réflectance à deux longueurs d'onde (ΔR_{λ_1} et ΔR_{λ_2}) pendant une stimulation, si on connaît les coefficients d'extinction molaire des chromophores (ϵ_{HbO_2} et ϵ_{Hbr}) et le chemin différentiel (DP) pour chaque longueur d'onde (dont on fait l'hypothèse discutée plus loin qu'il est constant au cours du temps), il est possible de remonter aux variations des concentrations de l'oxyhémoglobine et la dé-oxyhémoglobine au cours du temps (ΔC_{HbO_2} et ΔC_{Hbr}). La technique permet ainsi d'obtenir les variations de saturation en oxygène des tissus S et de la concentration totale Hbt définies par :

$$S = \frac{[Hb_{O_2}]}{[Hb_{O_2}] + [Hb_r]} \quad [Hbt] = [Hb_{O_2}] + [Hb_r] \quad \text{Eq (4)}$$

3.2 Etat de l'art des études multispectrales chez le petit animal.

L'imagerie multispectrale été appliquée aux études chez le petit animal dans le contexte de l'étude du couplage neuroénergétique et neurovasculaire. Les travaux pionniers menés chez le rat par le groupe de John Mayhew à l'université de Sheffield à la fin des années 90, souffraient d'ambiguïté dans leur interprétation, du fait d'une prise en compte discutable du DP (Mayhew et al. 2000a). Ces études ont été reprises et une analyse spectrale rigoureuse proposée sur la base d'une estimation par simulation Monte Carlo du DP (Kohl et al. 2000). L'application de cette méthodologie a permis de fournir de nouvelles données quant à la présence ou non d'une diminution transitoire de l'oxygénation, lors d'une activation du cortex somatosensoriel (Lindauer et al. 2001). D'autres études ont été menées sur l'activation des cortex somatosensoriel (Devor et al. 2003; Dunn et al. 2005; Bouchard et al. 2009) du cortex à tonneaux et du cortex auditif (Sakaguchi et al. 2007) à l'exception notable du bulbe olfactif.

Un exemple des données produites est présenté sur la figure 30. Ces études ont été réalisées selon différents schémas instrumentaux : (i) l'enregistrement ponctuel des variations oxymétriques via un spectrophotomètre fibré (Mayhew et al. 2000b), (ii) l'utilisation d'un spectromètre à fente ajusté sur la zone activée (Malonek et al. 1997), (iii) l'imagerie associant une caméra CCD et une roue à filtre rapide (Dunn et al. 2005), (iv) l'acquisition de quatre images simultanées sur un même capteur par séparation optique (Prakash et al. 2007) et (v) l'illumination rapide par LEDs (Bouchard et al. 2009). Les performances atteintes permettent au mieux, l'enregistrement de 6 longueurs d'onde avec une résolution temporelle de l'ordre de quelques dizaines de millisecondes sur des champs de vue de quelques mm². Il faut noter que

certains points méthodologiques n'ont pas été abordés par ces travaux. En particulier l'évaluation du DP est réalisée par simulation MC sur des modèles de tissus monocouche homogène ou par des mesures expérimentales sur fantômes simplistes. Par ailleurs, aucune étude n'a été menée pour optimiser le nombre et le choix des longueurs d'onde utilisées pour les études en lumière visible chez le petit animal, bien que la méthodologie ait été développée pour les études en NIRS clinique.

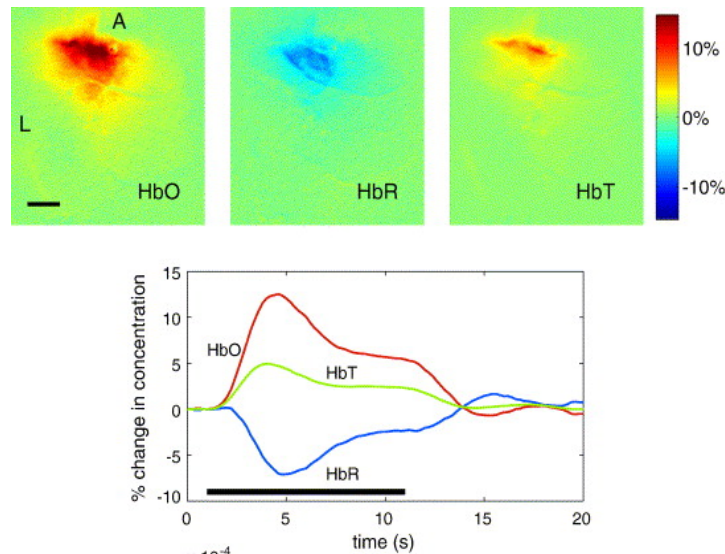


Figure 30. Données obtenues en imagerie multispectrale lors de l'activation du cortex somatosensoriel chez le rat. En haut, cartographie des variations relatives des concentrations en oxyhémoglobine, dé-oxyhémoglobine et hémoglobine totale. La barre d'échelle noire fait 1mm. En bas, données dynamiques moyennées pour un ensemble de pixels situés dans la zone activée et pour plusieurs stimulations successives. La barre noire indique la durée de la stimulation électrique (Adaptée de Dunn et al. 2005).

3.3 Architecture du dispositif pour l'imagerie multispectrale

Sur la base du dispositif construit pendant la thèse de Barbara L'Heureux pour l'IOSI, nous avons entrepris de tester différentes approches pour l'illumination séquentielle du tissu à différentes longueurs d'onde. Notre cahier des charges imposait de pouvoir illuminer sur une vaste plage de longueurs d'onde, avec une résolution spectrale de l'ordre de 10 nm. Du point de vue de la résolution temporelle, l'objectif est d'obtenir un cube spectral toutes les 200 ms. Ces contraintes fortes imposent l'utilisation d'un dispositif d'illumination avec basculement rapide d'une longueur d'onde à l'autre, associé à une caméra sensible permettant des temps d'exposition courts. La réflectance variant avec la longueur d'onde, il fallait également être en mesure d'adapter l'intensité lumineuse sur un large spectre. L'ensemble doit être parfaitement synchronisé par des signaux logiques et non par logiciel, pour éviter toutes dérives et désynchronisation de la prise d'image et de l'illumination. La volonté de pouvoir choisir les

longueurs d'onde et régler l'intensité de façon souple nous a conduit à rejeter le schéma classique utilisant une roue à filtre rapide (seul le modèle lambda DG Sutter relativement couteux permettait une résolution temporelle adéquate) qui limite le nombre de longueurs d'onde considérées.

Une solution envisagée dans un premier temps a été celle d'utiliser un filtre acousto-optique accordable (AA optics, Orsay). Ce dispositif permet, via l'interaction d'une onde acoustique dans un cristal de TiO₂, de sélectionner la longueur d'onde transmise par modification du pas du réseau d'indices optiques créé par l'onde acoustique. La vitesse de balayage en longueur d'onde est celle nécessaire à changer la fréquence de l'onde acoustique, soit de l'ordre de quelques dizaines de microsecondes. Une contrainte majeure de ce système réside dans la nécessité d'illuminer le cristal avec une source parfaitement collimatée car la séparation angulaire de l'ordre zéro (lumière blanche non diffractée) et du 1^{er} ordre diffracté à la longueur d'onde choisie, n'est que de 6° degrés. Cela impose par ailleurs d'implémenter un système de collection de la lumière hors axe après diffraction dans le cristal. Ce travail a été mené par Delphine Bourguoin, étudiante de M1 à l'Institut d'Optique à Palaiseau. Elle a pu caractériser la résolution spectrale du dispositif à environ 10nm et une résolution temporelle largement inférieure à la milliseconde. L'interfaçage logiciel du cristal a également été réalisée sous Labview et permettait un balayage rapide en longueurs d'onde, synchronisé sur la prise d'image. Outre la relative difficulté de mise en œuvre, le défaut majeur qui nous a fait abandonner ce dispositif est la faible transmission du cristal aboutissant à des niveaux de lumière faibles et nécessitant des temps d'exposition incompatibles avec la résolution temporelle souhaitée.

La solution finalement retenue consiste à associer une source blanche à un réseau diffractant et à une matrice digitale de micro-miroirs. La matrice de micro-miroirs est identique à celle utilisée dans les vidéoprojecteurs actuels. Les miroirs sont indépendants et peuvent être basculés en position ouverte ou fermée en quelques dizaines de microsecondes. Cette source commerciale bien qu'encore proche du prototype (One light spectra, Canada), a été appliquée pour la première fois à l'imagerie in vivo dans le cadre de nos projets. Le pilotage de la matrice de micro-miroirs a été réalisé sous Labview, le choix des lignes de miroirs « ouverts » permet la sélection de la bande spectrale transmise, la sélection des colonnes permet de régler l'intensité. L'architecture du système d'imagerie multispectrale que nous avons développé dans le cadre de la thèse de Rémi Renaud (2009-2012) est similaire à celui présenté sur la figure 24. Le système se compose du même dispositif d'imagerie (stéréomicroscope et caméra CCD) auquel nous avons ajouté la source d'illumination spectrale. Un premier PC a pour rôle de

piloter la caméra, acquérir les images et de déclencher le stimulus olfactif. Un second PC est dédié à la gestion de la source lumineuse. Cette architecture permet d'éliminer les temps morts et irrégularités temporelles de la prise d'image (temps d'exposition, temps inter-images, temps de lecture) générés par la gestion logicielle de la lampe. La synchronisation entre la prise d'image et le changement de longueur d'onde est réalisée par la sortie « exposure out » de la caméra comme décrit sur le schéma de la figure 31. Dans un premier temps nous utilisons directement la sortie caméra puis nous avons utilisé un dispositif microcontrôleur pour synchroniser le balayage en longueur d'onde, la prise d'image et l'ouverture des vannes de l'olfactomètre. La construction de ce dispositif a été l'occasion de développer les compétences d'interfaçage au laboratoire avec notamment la mise en œuvre dans une seule application des logiciels libres micromanager et imageJ et de la plateforme à microcontrôleur Arduino respectivement pour l'acquisition et l'analyse d'image en tant réel et la synchronisation des différents éléments. Les performances de la source lumineuse en stabilité spectrale et intensité ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre bas bruit et d'un puissance-mètre calibré. Ces mesures ont montré, après chauffage de la lampe, une stabilité excellente (dérive spectrale inférieure à 2nm et dérive en intensité inférieure à 0,01%) compatible avec les mesures des variations de réflectance spectrales sur des intervalles de l'ordre de la minute et pour des durées d'expériences de plusieurs heures.

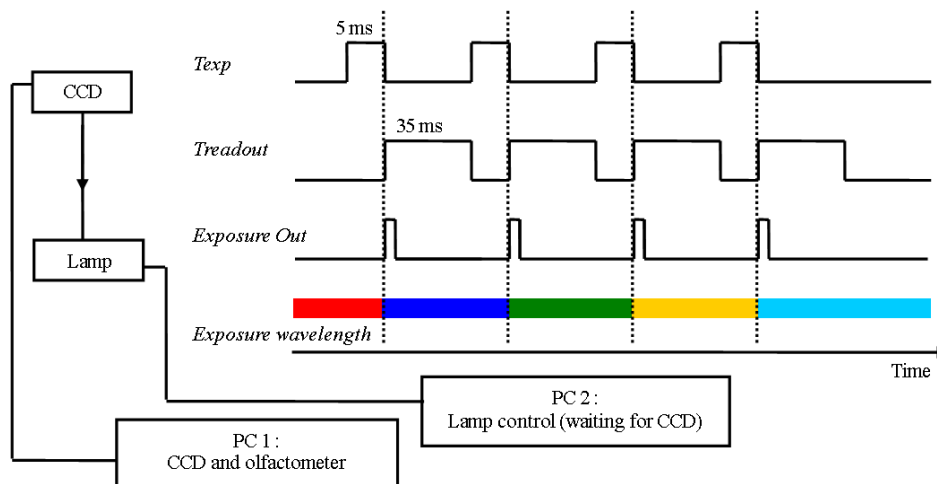


Figure 31 : Diagramme des signaux temporels du système multispectral. C'est le signal de fin d'exposition « exposure out » de la caméra CCD qui déclenche le changement de longueur d'onde pour la lampe qui fonctionne en mode « esclave » par rapport à la caméra CCD. Celui-ci a lieu en quelques centaines de microsecondes durant la période de lecture du CCD (Adapté de Renaud et al. 2011).

3.4 Evaluation du « Differential Pathlength » (DP)

Un des points clés pour l'obtention des paramètres hémodynamiques à partir des images de réflectance est l'estimation du chemin moyen parcouru par les photons (noté DP dans la suite) pour chacune des longueurs d'onde utilisées. Sur la base des travaux de Mathias Kohl, la plupart des études s'appuient sur des simulations Monte Carlo (Kohl et al. 2000). La détermination du DP par des mesures expérimentales sur fantômes constitués d'absorbants et de diffuseurs en solution permet de prendre en compte la réalité du dispositif de détection (géométrie et optique) mais ne prend pas en compte l'hétérogénéité des tissus cérébraux (Prakash et al. 2007; Sheth et al. 2009). La détermination du DP par des mesures résolues en temps (Arridge et al. 1992) nécessite une instrumentation coûteuse et est difficile à implémenter *in vivo* à plusieurs longueurs d'onde puisqu'elles nécessitent des impulsions laser courtes associées à un système de comptage de photon unique. Il faut cependant noter que les études cliniques en imagerie optique diffuse se sont dirigées progressivement vers la détection dans le domaine fréquentiel, qui permet d'obtenir une estimation directe des DP. Des évaluations fines du DP ont été réalisées par ailleurs pour les études cliniques, associant imagerie IRM et simulation Monte Carlo, pour une détermination précise du DP et de la participation de chacune des couches cérébrales aux signaux oxymétriques (Okada et al 1997, 2003). Cette approche n'avait jusqu'à présent pas été reprise et adaptée pour les études chez le petit animal. Pourtant une mesure précise du DP est a priori encore plus importante chez le rat et la souris, du fait des dimensions réduites des couches cérébrales. Nous avons développé cette approche tant pour le cortex somatosensoriel que pour le bulbe olfactif. Ce travail a été mené sur la base des modèles MC en couches développés par Barbara L'Heureux (figure 26) Il a montré (i) la relative insensibilité à la complexité des modèles considérés (homogène ou multicouches) (ii) la sensibilité du DP à l'épaisseur des géométries considérées, (iii) la nécessité de considérer un DP spécifique pour chaque structure cérébrale pour les longueurs d'onde au delà de 600nm comme le montre la figure 32.

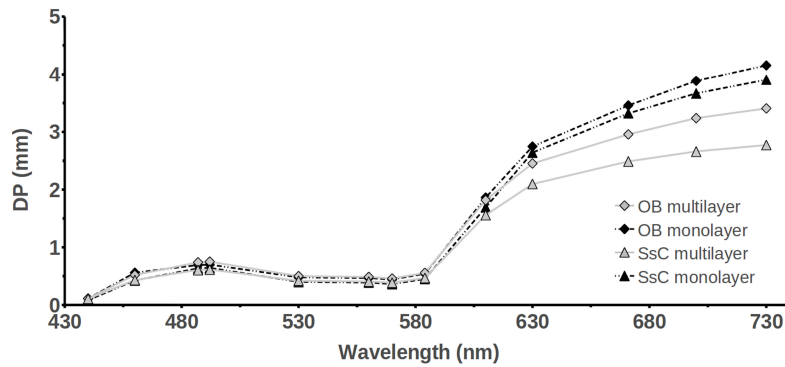


Figure 32. Estimation du DP pour des modèles monocouches et multicouches du Css et du BO (adapté de Renaud et al. 2012a).

Sensibilité du DP aux variations hémodynamiques

Nous avons par ailleurs montré la nécessité d'utiliser des longueurs d'onde entre 430 et 630 nm car, au delà, l'hypothèse d'un DP insensible aux variations hémodynamiques dues à l'activation cérébrale n'est plus valide comme indiqué sur la figure 33. Une augmentation ou une diminution significative du DP intervient lorsqu'on considère une variation de l'ordre de 10% des coefficients d'absorption et de diffusion et de 5% du coefficient d'anisotropie. Pour chaque cas, nous avons considéré une variation locale ou globale du paramètre optique étudié. Ces données montrent une faible influence des variations des coefficients optiques dans des bornes physiologiques sur le DP pour le BO à l'exception des longueurs d'onde au delà de 630 nm, clairement plus sensibles aux variations des paramètres optiques, du fait d'un parcours plus important des photons rétrodiffusés dans les tissus. On remarque également une influence conséquente des variations globales d'anisotropie. Cependant, en l'absence de données publiées, nous avons réalisé un calcul selon la théorie de diffusion de Mie sur la base de modification de volume réalistes des diffuseurs (vaisseaux (nos données) et mitochondries (Homola et al. 2006)). La conclusion de ces calculs théoriques est que les variations physiologiques de l'anisotropie devaient être localisées et se situer quantitativement autour de 1%. Les simulations MC valident donc l'hypothèse d'un DP constant au cours de l'activation du bulbe olfactif pour les longueurs d'onde inférieures à 630 nm.

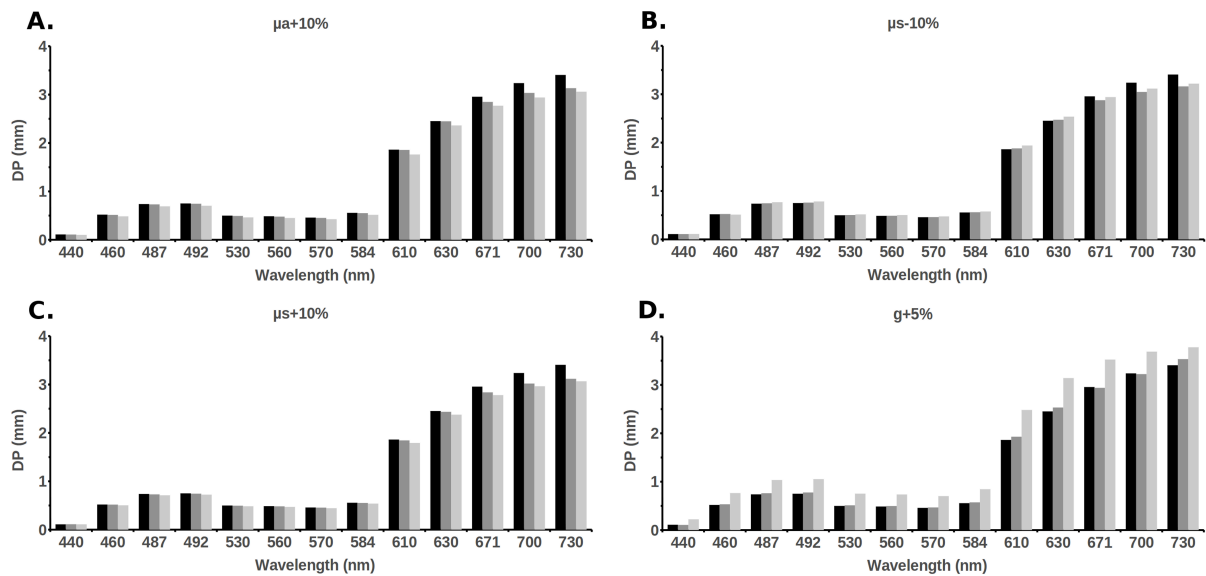


Figure 33. Influence des variations locales et globales des paramètres optiques sur les valeurs du DP. En noir, DP à l'état basal, en gris foncé, DP pour une variation locale du paramètre optique, en gris clair, DP pour une variation globale (adaptée de Renaud et al. 2012a).

Influence de l'os

L'imagerie spectrale au travers d'une couche d'os affinée est réalisable et souhaitable car elle permet de maintenir l'intégrité des tissus. Elle permet également les études longitudinales. Le calcul du DP par simulation Monte Carlo implique dans ce cas de mesurer a posteriori l'épaisseur de l'os affiné recouvrant les tissus étudiés. On observe sur la figure 34 qu'une couche d'os de 100 microns augmente sensiblement le DP sur l'ensemble du spectre, avec une variation en valeur absolue plus importante pour les longueurs d'onde élevées. Ces variations restent cependant modestes en valeur absolue pour les longueurs d'onde inférieures à 600nm.

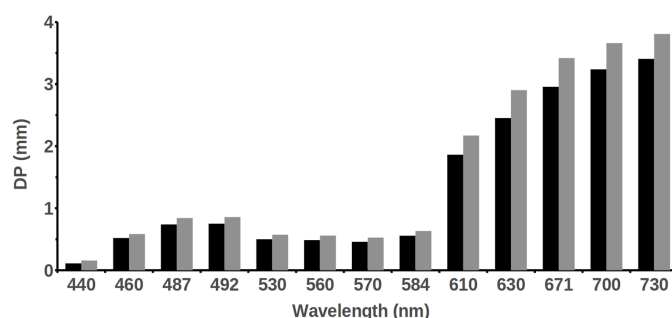


Figure 34. Influence d'une fine couche d'os sur le DP. En noir DP pour les tissu exposés (modèle multicouche). En gris, DP pour une préparation avec os affiné (modèle multicouche + 100 microns d'os). L'ensemble de ces résultats montre l'importance relative du choix des modèles pour la détermination du DP pour la gamme de longueur d'onde est située entre 400 et 630nm. L'estimation des paramètres hémodynamiques en utilisant différents DP a cependant démontré l'influence du modèle utilisé sur l'amplitude et le profil temporels des variations hémodynamiques comme cela est illustré sur la figure xx (adaptée de Renaud et al. 2012a).

Influence du DP sur les paramètres hémodynamiques

L'étape de finale de ces travaux a été d'évaluer l'influence du choix du modèle pour le calcul du DP sur les paramètres hémodynamiques obtenus par ajustements de la loi de Beer–Lambert modifiée sur les données expérimentales (Eq (3)). Les amplitudes des variations de concentrations du volume sanguin total (ΔH_{bt}) et de-oxyhémoglobine (ΔH_{bR}) sont dépendantes du modèle choisi avec une forte surestimation des variations hémodynamiques au maximum de l'activation si la variation du DP avec la longueur d'onde (est négligée figure 35 A et B). Les variations relatives de la concentration d'oxyhémoglobine (ΔH_{bO2}) sont les plus affectées puisque le profil des signaux est inversé lorsque la variation du DP est négligée (figure 35 C). L'utilisation du modèle multi couches conduit aux résidus les plus faibles, en particulier au niveau du pic d'activation (figure 35 D).

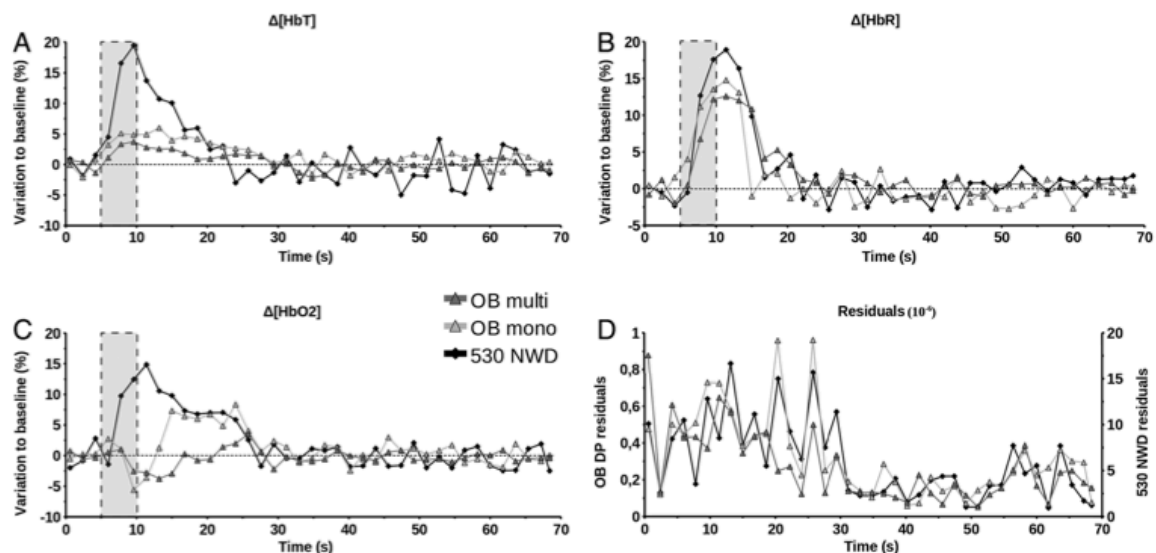


Figure 35. Influence du DP pour l'estimation des signaux hémodynamiques à partir de la réflectance. Les modèles utilisés sont (i) Bulbe olfactif multicouche (OB Multi en triangles gris foncés) (ii) Bulbe olfactif monocouche (OB mono triangles gris clairs), (iii) parcours identiques pour toutes les longueurs d'onde, choisi comme le parcours à 530nm (530 NWD ronds noirs) (adapté de Renaud et al. 2012a).

Nous avons également évalué l'influence des variations probables de la diffusion (Fayuk et al. 2002; Homola et al. 2006) lors de l'activation par la méthode du pseudo chromophore (Kohl et al 2000) mais nos données expérimentales n'ont pas permis de mettre en évidence ces variations. L'ensemble de ces résultats fournit une base méthodologique solide pour l'IOSI multispectrale dans le bulbe olfactif. Actuellement, l'ensemble des données multispectrales obtenues au laboratoire sont analysées en utilisant les DP obtenus avec le modèle multicouches du BO.

3.5 Optimisation du choix des longueurs d'onde

Plusieurs groupes utilisant la spectroscopie en proche infra rouge pour des études cliniques ont soulevé le problème de l'optimisation du nombre et du choix des longueurs d'onde (Yamashita et al. 2001; Uludag et al. 2002; Uludağ et al. 2004; Strangman et al. 2003). L'enjeu est d'une part d'optimiser la résolution temporelle des techniques en limitant le nombre de longueurs d'onde, et, d'autre part, d'estimer la précision des données quantitatives obtenues. L'approche proposée par Uludag est bien adaptée à nos modèles puisqu'elle définit deux paramètres à optimiser pour des géométries en couches: la diaphonie (« cross talk ») et la séparabilité (Uludag et al 2002). La diaphonie représente l'influence de la variation de la concentration d'un chromophore sur la détermination de la concentration d'un autre chromophore. Elle est calculée analytiquement et sur la base de simulations MC en considérant une variation d'un chromophore a et son impact sur la détermination de la variation de la concentration du chromophore b. Pour une approche considérant deux chromophores, l'expression de ce paramètre est donnée par :

Eq (5)

$$C_{a \rightarrow b} = \frac{\varepsilon_a(\lambda_1) \cdot \varepsilon_a(\lambda_2) \cdot (I_j^*(\lambda_2) - I_j^*(\lambda_1))}{\varepsilon_a(\lambda_1) \cdot \varepsilon_b(\lambda_2) \cdot I_j^*(\lambda_1) - \varepsilon_a(\lambda_2) \cdot \varepsilon_b(\lambda_1) \cdot I_j^*(\lambda_2)}$$

Où ε_a et ε_b coefficients d'extinction molaires des chromophore considérés aux deux longueurs d'onde λ_1 et λ_2 , I_j^* sont les parcours relatifs dans la $j^{\text{ème}}$ couche tissulaire qui sont définis comme le rapport du parcours dans la couche sur le parcours total à la longueur d'onde considérée. Plus la valeur du coefficient C est faible plus la diaphonie est faible. La séparabilité tente de prendre en compte les différentes sources de bruits du dispositif et leur influence sur les paramètres hémodynamiques estimés. Le faible niveau de bruits du système que nous avons utilisé (caméra CCD refroidie à bas bruit de lecture et à grande profondeur de puits associé à une source lumineuse à alimentation stabilisée) a montré que ce paramètre n'était pas limitant. Nous avons évalué la diaphonie pour des doublets et des triplets

de longueurs d'onde. A titre d'illustration, la figure 36 montre les coefficients de diaphonie pour les paires de longueurs d'onde choisies entre 440 et 640 nm pour le modèle en couches du BO présenté précédemment (figure 26).

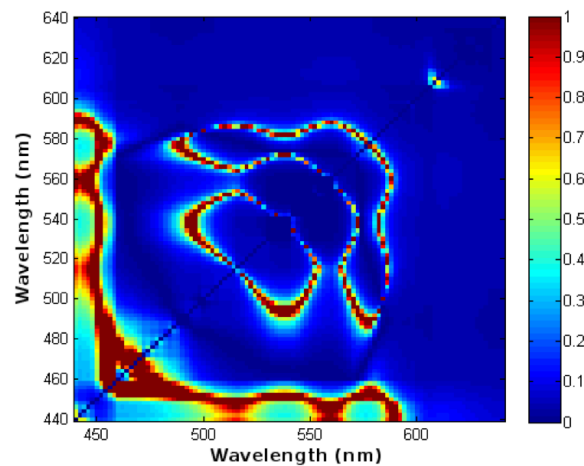


Figure 36 : Coefficients de diaphonie pour différents couples de longueurs d'onde sur la gamme 440-640nm

On voit que la paire 450nm/555nm présente un coefficient proche de 1 indiquant une diaphonie importante. A l'inverse le couple à 470nm/555nm montre une diaphonie quasi nulle. Nous avons démontré théoriquement que le triplet 530nm/584nm/630nm présentait une choix optimal puisqu'il présente une diaphonie très faible et présente une bonne robustesse puisque tous les triplets dans une fenêtre spectrale de +/-5nm autour de ces valeurs présentent également une diaphonie très faible (Renaud et al. 2012b). Ces résultats théoriques ont été confirmés par les mesures expérimentales *in vivo* à partir desquelles nous avons extrait les cartes des variations hémodynamiques au maximum de l'activation pour trois triplets différents (figure 37). On observe un meilleur contraste, en particulier pour les variations de la concentration en oxyhémoglobine (colonne de gauche) pour le triplet C (ligne du bas) qui présente la plus faible diaphonie théorique. L'étude de la dynamique des variations hémodynamiques dans la zone glomérulaire activée, confirme cette influence importante du choix des longueurs d'onde sur la quantification des variations hémodynamiques. Comme le montre la figure 38, si les profils sont conservés, la variabilité du signal est nettement plus importante pour un triplet non optimal. L'amplitude des signaux pour le triplet non optimal (triangles gris) est environ le double de celle observée pour le triplet optimal (carrés noir)

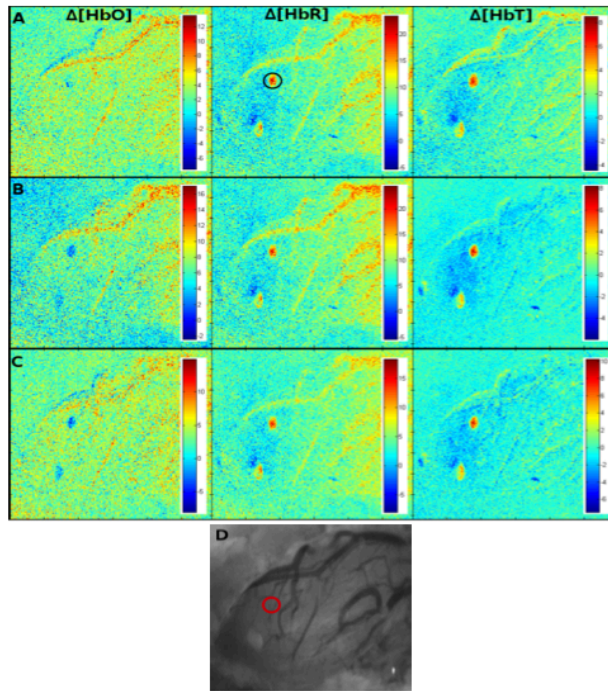


Figure 37. Cartographie des variations hémodynamiques au maximum d'activation déterminées pour les variations de réflectance à trois longueurs d'onde. (A) 485/530/584nm, diaphonie 0,15 (b) 584/610/630 nm diaphonie 0,05 (C) 530/584/630 nm diaphonie 0,02. (D) carte anatomique obtenue en lumière verte au repos. Le cercle rouge indique la localisation de la zone glomérulaire identifiée par le cercle noir sur les cartes hémodynamiques (Adapté de Renaud et al 2012b).

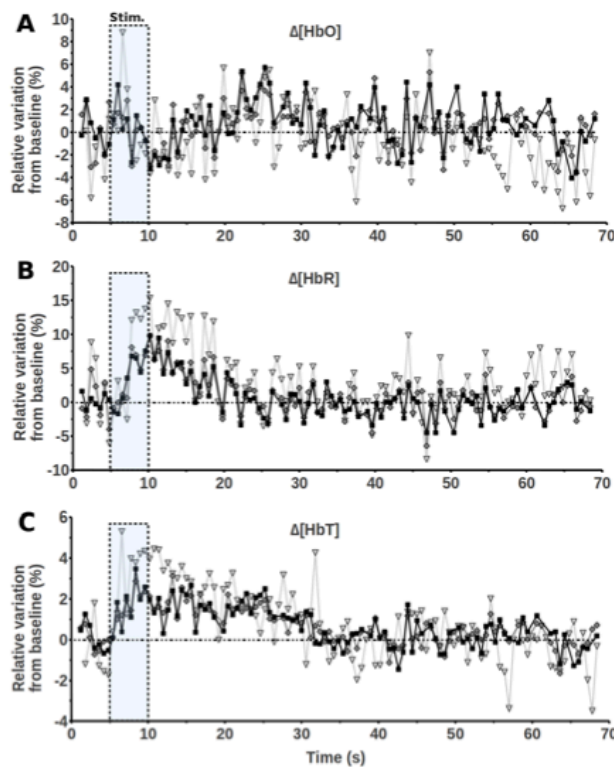


Figure 38. Influence du choix des longueurs d'onde sur la détermination des variations hémodynamiques. Les dynamiques sont obtenus à partir de la région d'intérêt indiquée par le cercle noir sur la figure 37 En noir triplet « optimal » (530,584,630)nm, en gris triplet non optimal (485,530,584)nm (Adapté de Renaud et al 2012b).

Ces données nouvelles pourraient expliquer la grande variabilité des données de la littérature concernant la variation des paramètres hémodynamiques lors d'une activation cérébrale, y compris sur une même structure avec un même protocole de stimulation.

3.6 Premiers résultats in vivo et ...nouvelles questions

Nous avons obtenues les premières données multispectrales sur le modèle d'activation du bulbe olfactif à partir de fin 2010. Elles diffèrent des données obtenues lors de l'activation du cortex somatosensoriel (figure 30, Dunn et al, 2005), sur plusieurs points :

- (i) lors de l'activation, la réflectance diminue quelque soit la longueur d'onde (figure 39).
- (ii) l'intensité des variations de réflectance est globalement d'un ordre de grandeur supérieur à celle observée dans le cortex somatosensoriel (figure 39).
- (iii) Pour certaines acquisitions, le décours temporel des signaux de réflectance varie selon la longueur d'onde, les signaux à 630nm étant sensiblement plus « rapides » tant dans leur initiation que dans leur retour à la ligne de base (figure 40).

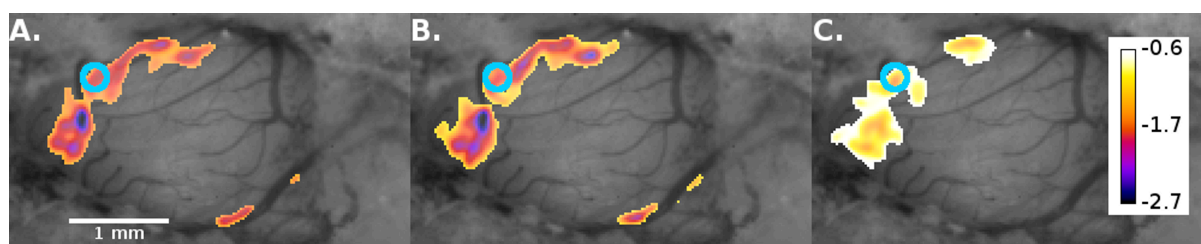


Figure 39 : Cartographies pour différents longueurs d'onde des variations de réflectance prises au temps correspondant au maximum des signaux. L'activation du bulbe olfactif est obtenue par présentation d'une odeur d'amande diluée à 10%. A) 584nm B) 530nm C) 630nm (adaptée de Renaud et al 2012a).

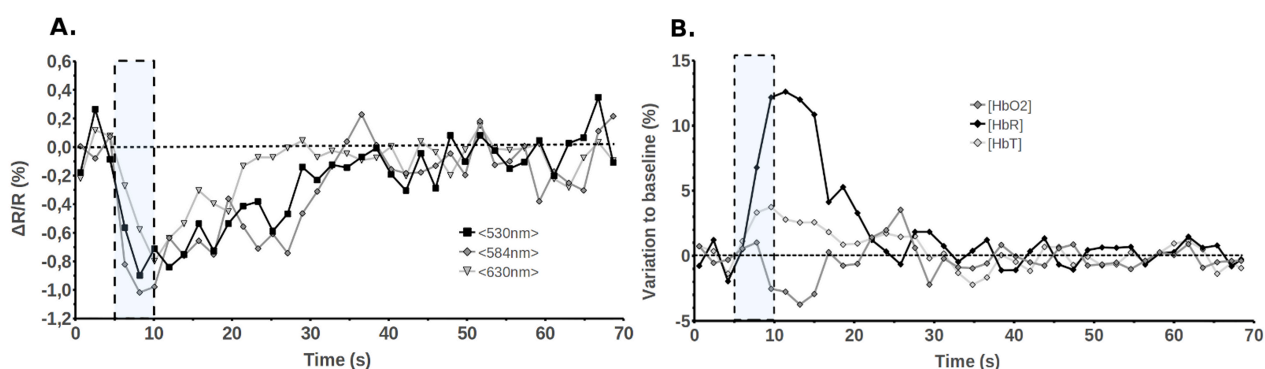


Figure 40 Décours temporel des signaux de réflectances observés à trois longueurs d'onde et signaux hémodynamiques associés (adaptée de Renaud et al 2012a). Les courbes sont obtenues à partir de la région d'intérêt définie par le cercle bleu sur la figure 39.

Ces résultats corroborent l'intuition de Meister et Bonhoeffer qui indique que les signaux de réflectance ont des origines physiques différentes selon les longueurs d'onde (Meister & Bonhoeffer 2001). Plus précisément, les signaux intrinsèques sont constitués de différentes contributions (volume sanguin, oxygénation et variation de la diffusion). Une hypothèse est que les contributions liées à la diffusion deviennent plus importantes lorsque la longueur d'onde augmente. De premières études ont tenté de mesurer la composante « rapide » des signaux intrinsèques, attribuée aux effets de diffusions (Rector et al. 2005). En effet, des études anciennes, parmi les premières à utiliser la lumière visible pour sonder le vivant) ont montré, sur des préparations de nerfs isolés, que le passage d'un influx nerveux produisait des variations des propriétés de diffusion et de biréfringence du nerf (Hill & Keynes 1949; Cohen et al. 1970). Par ailleurs, de nombreuses études en imagerie intrinsèque sur tranche vivante mais largement dépourvue de sang ont montré la présence d'une composante rapide, attribuée de nouveau au passage de l'influx nerveux mais également à différents phénomènes, comme la diffusion de métabolites, les variations d'osmolarité et la dilution apparente des diffuseurs (Fayuk et al. 2002). Ces contributions pourraient peut être être étudiées par tomographie optique cohérente, puisque des études préliminaires ont montré la capacité de cette technique sensible aux modifications de diffusion, à fournir des images fonctionnelles lors d'une activation sensorielle (Aguirre et al. 2006; Chen et al. 2009) .

D'un point de vue physiologique, les signaux hémodynamiques obtenus par l'analyse multispectrale montrent:

- (i) une augmentation locale du volume sanguin total.
- (ii) une augmentation marquée de la concentration en de-oxyhémoglobine.
- (iii) une diminution transitoire de la concentration d'hémoglobine oxygénée.

Comme les signaux de réflectance dont elle est déduite, cette réponse vasculaire diffère sensiblement de ce qui est observé pour le cortex somatosensoriel chez le rat, à savoir, une augmentation des concentrations d'oxyhémoglobine et d'hémoglobine totale associée à une diminution de la concentration de de-oxyhémoglobine (figure 30 B). Cependant, des résultats similaires aux nôtres ont été observés pour une activation du cortex somatosensoriel chez la souris (Prakash et al 2007). De plus, la diminution transitoire de l'oxygénation a été observée à l'échelle des capillaires par microscopie bi-photonique (Lecoq et al 2009). Ces résultats apportent des données nouvelles dans le contexte de l'étude du couplage neurovasculaire et, en

particulier, concernant la présence ou non d'une de-oxygénation transitoire ou soutenue lors de l'activation. Afin de confirmer ces résultats nous allons mesurer les variations de pression partielle en oxygène directement dans les tissus à l'aide d'une électrode implantée dans un glomérule activé ou dans sa proximité.

Plusieurs points restent à éclairer et nécessiteront des travaux supplémentaires tant du point de vue du nombre d'animaux enregistré que de la méthodologie mise en œuvre. En premier lieu, ces premières études ont montré la sensibilité des profils hémodynamiques obtenues au choix du DP utilisé dans le modèle. Ces DP, bien qu'étant estimés avec précision, n'en demeurent pas moins basés sur des simulations Monte Carlo et non sur des mesures directes. Une réévaluation des propriétés optiques à l'échelle tissulaire sera nécessaire pour nourrir des modèles Monte Carlo plus réalistes. Par ailleurs, le système d'imagerie possède une profondeur de champ dans le plan image nettement plus importante que l'épaisseur de la couche glomérulaire (figure 25). L'étude de l'origine des signaux en fonction de la profondeur à l'aide d'un microscope, alliant luminosité et faible profondeur de champ, sera nécessaire pour affiner la compréhension de l'origine des signaux intrinsèques tant en réflectance qu'en autofluorescence. Ce travail qui a été initié en 2011 (stage de M1 de Benjamin Boitrelle), permettra d'optimiser la résolution spatiale axiale de nos enregistrements. Au delà des mesures expérimentales, un travail par simulation a été mené récemment par le groupe de David Boas (MGH Boston) afin de déterminer la sensibilité en fonction de la profondeur pour différentes modalités d'imagerie optique 2D ou la mise en œuvre d'une même technique chez deux espèces différentes (Tian et al 2010). Considérant nos simulations des signaux d'autofluorescence pour deux structures différentes et nos premiers résultats en imagerie multispectrale comparés aux signaux observés dans le cortex somatosensoriel, cette question nous semble essentielle. En effet, une question soulevée par ces résultats est la suivante : deux structures cérébrales activées peuvent elles présenter des signaux vasculaires distincts ? En corollaire à cette question on peut s'interroger sur l'origine de ces différences : dans l'hypothèse « biologique » , la réponse vasculaire et métabolique est distincte pour chaque structure cérébrale; dans l'hypothèse « anatomo-physiologique », c'est la structure (par exemple la densité en capillaires) et les propriétés optiques distinctes des couches tissulaires qui sont à l'origine de cette différence (Tian et al. 2010). Une double approche associant enregistrements des signaux in vivo et simulation sur des modèles réalistes semble donc nécessaire pour résoudre ces questions.

4 Production scientifique

Articles dans des revues à comités de lecture

Renaud R, Martin C, Gurden H, **Pain F** Multispectral reflectance imaging of brain activation in rodents: methodological study of the differential path length estimations and first in vivo recordings in the rat olfactory bulb (2012) *Journal of Biomedical Optics*; 17(1)

Viggiano A, Marinesco S, **Pain F**, Martin C, Gurden H (2012) “Reconstruction of field excitatory post-synaptic potentials in the dentate gyrus from amperometric biosensor signals” *J Neuroscience Methods* 206(1) 1-6

Chery R, L’Heureux B, Bendahmane M, Renaud R, Martin C, **Pain F**, Gurden H (2011) « Imaging odor-evoked activities in the mouse olfactory bulb using optical reflectance and autofluorescence signals » *Journal of Visualized Experiments* 56 e3336.

Pain F, L’Heureux B, Gurden H (2011) « Visualizing odor representation in the brain : a review of imaging techniques for the mapping of sensory activity in the olfactory glomeruli” *Cell Mol Life Sci* ;68(16) 2689-709

L’Heureux B, Gurden H, **Pain F**. (2009) Autofluorescence imaging of NADH and flavoproteins in the rat brain: insights from Monte Carlo simulations *Optics Express* ; 17, 9477-9490.

Chapitre d’ouvrage

Imagerie optique biomédicale (en cours 2012) Ed CNRS MCT

Communications orales

Renaud R Martin C Gurden H **Pain F** (2012) “Combinaison de l’imagerie multispectrale et de l’imagerie du contraste laser speckle pour l’étude de activation cérébrale” OPTDIAG2012- Paris

Renaud R Martin C Gurden H **Pain F** (2012) “Optimization of wavelength for multispectral imaging in the rodent brain” SPIE Photonics Europe, Bruxelles (Belgique)

Renaud R Martin C Gurden H **Pain F** (2011) “Multispectral imaging of olfactory bulb activation: influence of differential pathlength estimations” SPIE Photonics West BIOS , San Francisco, USA

Pain F- invited speaker « Radiosensitive and optical instruments development for the study of brain activation in vivo » (2010) Japan France Frontiers of Engineering 1st Symposium JFTFoE ”, Minatec, Grenoble.

Pain F, Renaud R, Martin C Gurden H “Imagerie hyperspectrale de l’activation cérébrale chez le rongeur » journées thématiques du GDR Imagiv, Marseille (2010)

Pain F-invited speaker (2010) « Optical imaging of the neuronal activation : physical concepts and instrumentation » Rhein Ahr Universität, M Kohl’s Lab , Allemagne

Pain F –invited speaker- (2009) “Optical imaging of odor-evoked maps using intrinsic and autofluorescent signals in the olfactory bulb in vivo insights into neuro-energetics. Ecole des neurosciences de Paris, Workshop «Quantitative microscopy and bioinformatics »

Communication affichées

Renaud R, Martin C, Gurden H, **Pain F** “Hyperspectral imaging of the olfactory bulb activation : influence of the differential path length correction factor on the derivation of oxygenation and total hemoglobin concentration maps.” (2010) Gordon Research Conference on Brain Blood Flow and Metabolism, Andover, USA

Bendahmane, M. Martin C, **Pain F**, L’Heureux B, H Gurden (2009). Neuro-astrocytic modulation by the nutritional state in the olfactory bulb. EuroGLIA Paris.

L’Heureux B, Martin C, Giaume C, **Pain F**, Gurden H. (2009) Impairing astrocytic coupling modifies odor-evoked maps recorded by functional optical imaging in the olfactory bulb. EuroGLIA Paris.

J. Godart, A. Desbree, H. Gurden, F. Lefebvre, R. Matrippolito, **F. Pain**, L. Pinot, P. Laniece. Etudes quantitatives in vivo des processus neurophysiologiques et neuropharmacologiques locaux chez le petit animal, à l’aide d’une sonde radiosensible de haute résolution temporelle : la sonde PIXSIC. (2009) Colloque IFR 144 NeuroSud–Paris, Gif sur Yvette

L'Heureux B., Roux L., Giaume C., Pinot L., Lefebvre F., **Pain F.**, Gurden H.(2008) Functional optical signals and neuro-astrocytic networks in the rodent olfactory glomeruli. International Society for Neurochemistry - Brain Energy Metabolism (Beijing, China)

L'Heureux B., Gurden H., Lefebvre F., Pinot L., Janvier B., Mastrippolito R., Lanièce P., **Pain F.**(2008) Intrinsic and autofluorescent optical signals and the neuro-astrocytic activity in the rodent olfactory glomeruli. Society for Neuroscience (Washington, USA)

L'Heureux B., Gurden H., Pinot L., Lanièce P., Lefebvre F., **Pain F.**(2008) Recording of odor-evoked autofluorescence signals in the olfactory bulb: feasibility study with Monte Carlo simulations and preliminary images. Gordon Research Conferences - Brain Energy Metabolism & Blood Flow (Andover, USA)

L'Heureux B, Gurden H, Laniece P, **Pain F** (2007) Physical limits to autofluorescence signals in vivo recordings in the rat olfactory bulb : a Monte Carlo study. SPIE Conference on Biophotonics (Munich , Germany)

Gurden H., **Pain F.**, Mastrippolito R., Hantraye P., Mainen Z., Bonvento G., Laniece P.(2006)

Probing the role of glutamate uptake by astrocytes in odor-evoked functional signals in the olfactory bulb.

Gordon Research Conference, Magdalen collegen, (Oxford, United Kingdom)

Gurden H, **Pain F**, Desbree A., Mastrippolito R, Bonvento G, Hantraye P, Uchida N, Mainen ZF, Laniece P (2005) Odor evoked activation of olfactory glomeruli : an attractive model to probe neurometabolic and neurovascular coupling mechanisms by optical and radio-isotopic techniques. Society for Neuroscience Annual Meeting, (Washington, United states)

Meeting, (Washington, United states)

Articles de vulgarisation

Pain F, L'Heureux B, Martin C Gurden H. Plein Sud Special recherche 2010-2011 "Le cerveau à vue de nez"

5 Activités d'encadrements et d'enseignement sur la thématique de l'imagerie optique in vivo

Depuis le début de mes travaux pour la thématique de l'imagerie optique de l'activation cérébrale, j'ai encadré en stage plusieurs étudiants de niveaux L3 à M2 ainsi que deux doctorants. Ma philosophie pour aborder l'encadrement des stages est de fournir aux étudiants une expérience de la recherche en leur permettant d'acquérir des compétences « techniques » mais également d'envisager une « thématique de recherche » dans le cadre d'un travail en équipe. Cette approche se veut exigeante dans le niveau des projets proposés, et vise à responsabiliser les étudiants qui doivent comprendre qu'ils appartiennent à une équipe dont les différents éléments sont en interaction et pour certains aspects en interdépendance. Le fil conducteur des stages est que le travail réalisé doit être soit exploratoire, comme une étude de faisabilité instrumentale, soit concrètement utile aux développements instrumentaux ou à l'analyse des résultats expérimentaux. Le travail a en général été défriché au préalable ou est fortement balisé mais le rôle des étudiants ne se réduit en aucun cas à celui d'exécutant qui doit « produire » pour le laboratoire. Les étudiants participent à l'avancée globale du travail d'équipe qui en retour les accompagne dans leur apprentissage des connaissances et méthodologies.

Jusqu'à présent j'ai pu encadrer des étudiants ayant des niveaux de connaissances théoriques et pratiques assez hétérogènes, mais quand la question à résoudre est clairement inscrite dans un ensemble plus vaste et compréhensible, ils ont généralement fait preuve de beaucoup d'assiduité et d'enthousiasme et ont à leur quasi unanimité obtenu des évaluations très positives de leur travail. La dimension pluridisciplinaire de nos travaux participe sans aucun doute à cette dynamique puisque les étudiants physiciens sont confrontés à une thématique d'interface et à des neurobiologistes au sein même du laboratoire. Ils découvrent ainsi d'autres manières de raisonner et de travailler, ce qui, y compris pour des étudiants se destinant à des études en physique fondamentale s'avère particulièrement enrichissant. Du point de vue du laboratoire, il est évident que les travaux débutés en stage ont souvent constitué les briques élémentaires de travaux plus conséquents menés dans le cadre de thèses. Ainsi la thèse que j'encadre actuellement s'intéresse à l'imagerie multispectrale de l'activation cérébrale et s'est appuyée dans sa première année sur des travaux réalisés précédemment lors de deux stages de M1, respectivement sur la simulation MC en géométrie complexe et sur l'évaluation de sources spectrales à commutation rapide. Le tableau 5 ci-dessous résume les encadrements de stages réalisés au cours des dernières années.

Nom	Niveau	Durée	Sujet	Année
Djamila Bouargha	M1	3 mois	Développement d'un système d'imagerie optique intrinsèque	2006
Robin Puech	L3	2mois	Développement de la simulation Monte Carlo des photons optiques en géométrie simple	2006
Robin Puech	M1	3mois	Développement de la simulation Monte Carlo en géométrie en couches	2007
Barbara L'Heureux	M2	6mois	Caractérisation et validation d'un système d'imagerie optique de l'activation du bulbe olfactif	2007
Larissa Mengue	M1	3mois	Faisabilité de l'imagerie laser speckle du débit sanguin	2008
Nirilanto Ramamonjisoa	M2	4 mois	Analyse des cartes d'activation par ondelettes	2008
Thibault Laurent	L3	6 semaines	Faisabilité de la mesure des propriétés optiques des tissus cérébraux	2009

Delphine Bourguoin	M1/ institut d'Optique	4 mois	Construction et caractérisation d'une source pour l'imagerie multispectrale	2009
Benjamin Boitrelle	M1	2 mois	Construction de système optique macroscopique à faible profondeur de champ	2011
Alexandre Fortin	L3	6 semaines	Ecriture de macros et Plugin ImageJ pour l'analyse des signaux optiques au laboratoire IMNC	2011

Tableau 5 Etudiants encadrés en stage dans le cadre de la thématique d'imagerie optique

Encadrements de doctorant

Barbara L'Heureux « Imagerie optique neuro-fonctionnelle des signaux intrinsèques en champ large dans le bulbe olfactif chez le petit animal » (2006-2009) co-encadrement avec H Gurden. Pour la thèse de Barbara L'Heureux j'ai encadré plus particulièrement les travaux de simulations MC et les développements instrumentaux et méthodologiques pour la construction et la caractérisation du dispositif d'imagerie

Rémi Renaud « Imagerie multispectrale de l'activation cérébrale » (2009-2012)

Bien que l'Habilitation à Diriger des Recherches s'intéresse a priori essentiellement au versant recherche du métier d'enseignant-chercheur, il a m'a semblé important d'y décrire brièvement comment ces activités de recherche fécondent mes activités d'enseignement. Au cours des années 2007-2009 j'ai obtenu un congé partiel de mon service d'enseignement pour changement de thématique. Cela m'a permis (i) de structurer mes recherches en imagerie optique initiées depuis 2005 (ii) de m'impliquer fortement dans l'encadrement de thèse de Barbara L'Heureux et (iii) de développer de nouveaux enseignements spécialisés, sur la base de mes activités de recherche. En particulier, j'ai développé un cours d'optique médicale et les TP associés dans le cadre de la 5e année de l'école d'ingénieurs Polytech de l'Université Paris Sud. Ce cours, en évolution importante d'une année sur l'autre, me permet d'aborder avec ces étudiants en fin de cycle des problématiques instrumentales en optique biomédicale, souvent en lien fort avec mes thématiques de recherche. Il m'est ainsi possible de transmettre aux étudiants un large panorama et quelques idées prospectives sur ce domaine en évolution rapide tant au plan national qu'international. Ainsi, les retours de conférence sont l'occasion de mettre à jour le cours et ses références, tout en y introduisant les thématiques porteuses. Le volume horaire

étant limité, je me suis volontairement limité aux techniques in vivo tant précliniques que cliniques. Le cours couvre donc les propriétés optiques des tissus biologiques et la simulation MC, la spectroscopie et l'imagerie oxy-métrique, les imageries optiques cliniques avec en particulier l'OCT, l'imagerie photo-acoustique et les utilisations thérapeutiques des laser : photo-ablation et thérapie photo-dynamique. Enfin, une partie du cours est consacrée à une présentation rapide des techniques de microscopie en cours de transfert vers la clinique, en particulier les différentes modalités des microscopie de fluorescence et les microscopies non linéaires. Une partie de ce cours a par la suite été adaptée pour constituer une introduction aux sources de contraste optique dans les tissus biologiques dans le cadre du module d'enseignement « technique d'imagerie en neurosciences » du M2 « signalisation et neurosciences ».

6 Conclusion personnelle de cette étape.

Cette deuxième phase de mes activités de recherche a été rendue possible par trois catalyseurs essentiels. Le premier est très certainement l'arrivée de Hiram Gurden au laboratoire à la fin du cycle initié avec mes travaux de thèse, et, les discussions que nous avons pu avoir pour « monter une thématique » ensemble. Le second élément est celui d'avoir eu la chance de recruter Barbara L'Heureux en thèse pour initier ces travaux. Barbara, de part sa formation de physicienne et son ouverture aux neurosciences, était l'étudiante idéale pour tout à la fois développer les outils, en particulier la simulation MC et exploiter in vivo les techniques développées. Enfin, le troisième élément est la possibilité accordée par l'université de bénéficier d'un congé d'enseignement pour recherche et conversion thématique, qui s'est concrétisé pour moi par une charge d'enseignement diminuée de moitié pour les années 2007-2009.

Au cours de cette réorientation thématique, j'ai appris à connaître la communauté des scientifiques à l'interface optique / biologie / médecine qui est une communauté jeune, ouverte et en plein essor ou le dialogue entre instrumentaliste et biologiste m'est apparu plus aisé que pour l'imagerie isotopique. Le domaine bénéficie paradoxalement de l'absence de communauté clinique associée qui peut avoir un poids écrasant vis-à-vis de l'imagerie du petit animal (il est d'ailleurs symptomatique que celle-ci soit souvent désignée comme imagerie pré-clinique et non comme une thématique à part entière). Enfin, la proximité des physiciens instrumentalistes ou théoriciens avec les neurobiologistes est forte dans cette communauté où les laboratoires sont souvent bâtis autour de cette interdisciplinarité. Les physiciens sont immergés dans les

thématiques de neurobiologie et les biologistes sont fortement conscients des enjeux instrumentaux pour l'obtention de nouvelles données. Ainsi, là où la conférence « IEEE Medical Imaging » regroupe essentiellement des instrumentalistes, physiciens d'hôpitaux et quelques médecins et biologistes, les conférences comparables dans le domaine optique (SPIE photonics par exemple) regroupent une communauté où les interactions entre physiciens, instrumentalistes, biologistes et médecins sont plus faciles. Il faut souligner que parmi les jeunes chercheurs de cette communauté, de plus en plus de profils regroupent plusieurs compétences à l'interface comme l'instrumentation et l'expérimentation animale.

La communauté de l'imagerie optique biomédicale bénéficie par ailleurs, de la légèreté des techniques et du grand nombre de composants optiques développés pour d'autres secteurs de l'industrie. Il est ainsi relativement aisé de construire en peu de temps et avec des moyens raisonnables, des modalités d'imagerie *in vivo* performantes sans disposer nécessairement d'un savoir faire de 30 ans dans le domaine. A ce titre, la communauté voit se côtoyer de gros laboratoires, qui jouent souvent un rôle moteur pour plusieurs approches en parallèles (par exemple les laboratoires d'optique clinique du Massachusetts General Hospital de Boston ou le laboratoire de Lihong Wang à l'université de Washington WUSTL ou encore les différents groupes de l'université d'Austin) mais également, des laboratoires plus modestes par leur dimension et leur budget. Ces derniers, dont notre laboratoire fait partie, tentent de tirer leur épingle du jeu via des idées instrumentales originales par leur mise en œuvre ou par les données biologiques obtenues. Enfin, la multiplicité des sources de contraste optiques tant endogènes que liées à des traceurs exogènes, constitue un réservoir quasi inépuisable de créativité pour les scientifiques du domaine. Ceci se traduit par un dynamisme sans cesse renouvelé tant du point de vue technique que des applications ainsi que par la structuration de la communauté. Ainsi, dans les années passées deux nouvelles revues périodiques dédiées ont été créées par les éditeurs et la conférence SPIE Optics qui regroupe toutes les thématiques d'optiques instrumentales a montré une expansion rapide et impressionnante de la communauté de bio-photonique. Considérant ce dynamisme, le changement de thématique amorcé vers 2005 et finalisé en 2007-2009 se révèle justifié *a posteriori* et à titre personnel très épanouissant. Face à des laboratoires disposant des moyens humains et financiers largement supérieurs aux nôtres, la stratégie poursuivie, dans le lignée de nos études en imagerie isotopique est celle de l'originalité. Autant l'instrument (la sonde SIC) était le porteur de cette originalité pour les études isotopiques, autant dans nos approches optiques c'est un ensemble associant un modèle physiologique original, des modalités optiques multiples et une approche biophysique des signaux enregistrés qui nous permet de proposer des approches méthodologiques et des données nouvelles.

Partie III Projets en cours et futurs

Dans cette dernière partie du document, je présenterai brièvement les projets instrumentaux et méthodologiques que je conduis actuellement et que je souhaite mener dans les prochaines années. Certains de ces projets sont déjà « sur les rails » alors que d'autres sont encore à l'état de gestation. Dans le cadre du laboratoire, ces projets s'inscrivent dans le contexte de la restructuration des équipes du laboratoire et la création fin 2012 d'une nouvelle équipe « Imagerie biophotonique in vivo » dont j'assurerai la direction. Cette équipe regroupera 4 chercheurs permanents, dont un chercheur CNRS (Olivier Seksek) et 3 enseignant chercheurs (Darine Abi Haidar (recrutée en 2010), Gael Latour (recruté en 2012), et moi même). Les thématiques scientifiques poursuivies par l'équipe concernent les développements instrumentaux pour l'imagerie in vivo au sens large (préclinique et clinique) avec deux aspects applicatifs : l'imagerie de l'activation cérébrale (en collaboration étroite avec H Gurden et C Martin de l'équipe Métabolisme Imagerie Olfaction) et le développement de l'endomicroscopie optique non linéaire pour la signature optique des tissus cancéreux cérébraux.

Au sein de cette équipe, je poursuivrai mes développements en imagerie en champ large avec pour objectif à court terme, de disposer d'un système multimodal associant imagerie de fluorescence, imagerie multispectrale de réflectance et imagerie du contraste laser speckle. Par ailleurs, nous débutons actuellement avec Darine Abi Haidar, des développements instrumentaux en optique non linéaire pour l'imagerie cérébrale des tissus profonds chez le rongeur et pour le diagnostique peropératoire. Je vais maintenant présenter brièvement ces différents projets.

1 Imagerie multimodale en champ large

Au laboratoire IMNC, nous avons validé deux modalités d'imagerie 2D large champ et les méthodologies d'analyses associées pour l'étude de l'activation cérébrale in vivo :

- (i) l'imagerie intrinsèque multispectrale
- (ii) l'imagerie d'autofluorescence

Nous avons développé, au cours de la dernière année de thèse de Rémi Renaud, la cartographie du débit sanguin en champ large par Imagerie du Contraste Laser Speckle (ICLS). Cette

technique repose sur la diffusion de lumière cohérente par les diffuseurs biologiques en mouvement. Lorsque les tissus sont éclairés par une source lumineuse cohérente, ces diffusions induisent l'apparition d'interférences constructives et destructives et donc une figure de speckle variable au cours du temps. Si on filme cette figure avec un temps d'exposition proche du temps de corrélation des diffuseurs (ici les globules rouges circulants), on observe une variation du contraste lorsque les diffuseurs se déplacent. Une carte du contraste speckle est déterminée par le rapport entre l'écart type et l'intensité moyenne pour une fenêtre de 7 par 7 pixels, centrée sur le pixel concerné. Des modèles reliant les valeurs du contraste speckle aux modifications de la vitesse des diffuseurs ont été développés et validés (Duncan & Kirkpatrick 2008; Boas & Dunn 2010). Au cours du printemps 2012, nous avons également réalisé nos premières études des signaux neuronaux en imagerie calcique à l'aide de traceurs exogènes (Calcium green-dextran / Oregon-green dextran). Dans cette technique, un traceur calcique est déposé sur la muqueuse olfactive lésée de façon réversible. Le traceur est transporté en plusieurs jours de façon antérograde jusqu'aux terminaisons prés-synaptiques dans les glomérules permettant l'imagerie de fluorescence des signaux pré-synaptiques avec un excellent rapport signal sur bruit. (Wachowiak & Cohen 2001; Wachowiak & Cohen 2003).

Il est évident que la mise en œuvre de toutes ces techniques (IOSI multispectrale, ICLS, fluorescence endogène (AF) ou des traceurs calciques) de façon simultanée lors d'une même stimulation, permettrait de fournir des informations physiologiques complémentaires. L'acquisition de ces signaux lors d'une stimulation unique permettra de s'affranchir des variations inter-stimulation, liés aux paramètres physiologiques (anesthésie, habituation) et instrumentaux. Cela permettrait entre autre la corrélation spatiale et temporelle précise des signaux d'hémodynamiques et neuronaux sur un champ large. A notre connaissance, seuls quelques groupes ont pu regrouper imagerie speckle et imagerie multispectrale de réflectance sur un seul dispositif (Dunn et al 2005, Bouchard et al 2008). Prises indépendamment, l'IOSI multispectrale et de l'ICLS fournissent respectivement les cartographies des variations oxymétriques (concentrations en sang total ou Cerebral Blood Volume CBV, concentrations en oxy et dé-oxyhémoglobine) et les variations du débit sanguin (ou Cerebral Blood Flow CBF). En combinant ces deux modalités, on peut déterminer une cartographie de la consommation locale en oxygène (cMRO₂) (Dunn et al 2005). Un seul groupe a récemment combiné sur un même dispositif l'imagerie de fluorescence avec l'imagerie multispectrale et l'imagerie laser speckle (Sun et al. 2011). Un tel dispositif est en cours de développement avancé au laboratoire IMNC et nous permettra de disposer d'un instrument unique pour l'imagerie optique en champ large. Il s'appuie sur les développements déjà réalisés en IOSI

multispectrale et intègre de nouveaux composants : une diode laser modulable pour l'ICLS, un filtre accordable à cristaux liquide. L'ensemble des différents éléments est piloté sous Labview et synchronisé par un module microcontrôleur Arduino. Des résultats préliminaires ont été obtenus pour le couplage IOSI /ICLS (figure 41).

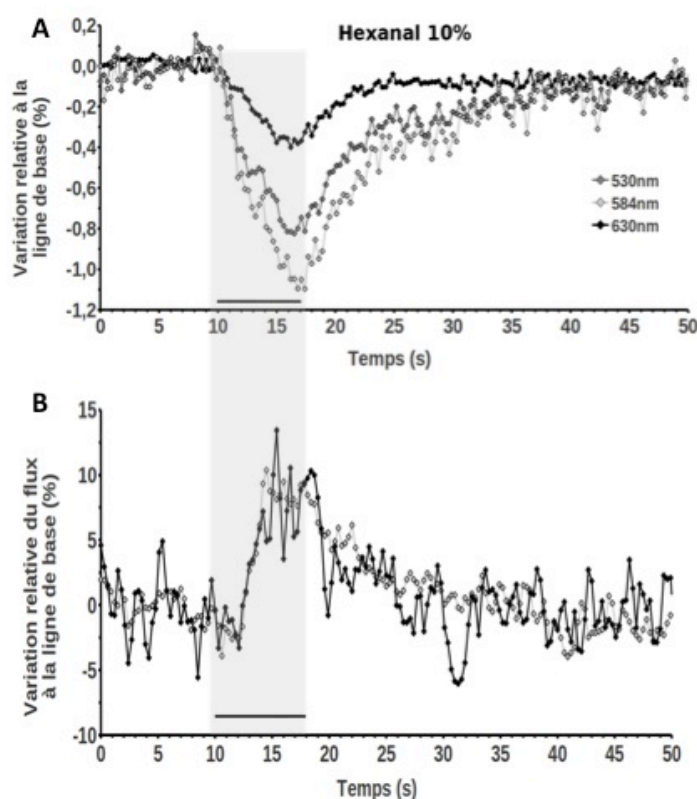


Figure 41 : Comparaison des signaux de réflectance multispectrale (A) et des variations relatives de flux (B) obtenus simultanément lors d'une stimulation unique. L'activation est obtenue par une stimulation à l'hexanal diluée à 10% pendant 7 secondes (barre grise). Les signaux du flux ont été obtenus pour deux régions d'intérêt, l'une « glomérulaire », l'autre « vasculaire » (Données non publiées thèse de R Renaud).

2 Illumination structurée en champ large

Les techniques d'imagerie en champ large que nous avons développées pourraient fortement bénéficier de l'utilisation d'une illumination structurée en remplacement de l'illumination homogène. La technique de microscopie en illumination structurée a été proposée comme alternative moins onéreuse à la microscopie confocale (Neil et al. 1997). Le principe consiste à illuminer les tissus non plus de façon homogène, mais, à l'aide d'un motif, généralement d'intensité périodique sinusoïdale. Trois images sont enregistrées pour trois positions différentes du motif (phases spatiales de 0 , $2\pi/3$, $4\pi/3$). Les images enregistrées contiennent à la fois l'information au plan focal et hors plan focal, cependant les signaux dans le plan focal

sont beaucoup plus fortement modulés que ceux hors plan focal. On peut alors, à l'aide d'algorithmes simples de démodulation obtenir une image du plan focal avec une résolution axiale beaucoup plus élevée qu'en microscopie en champ large en illumination homogène. Ce dispositif a été mis en œuvre et caractérisé pour la microscopie de fluorescence à l'échelle cellulaire sur la base de grille dont l'image est projetée sur le tissu et des cellules en cultures (Barlow & Guerin 2007; Langhorst et al. 2009). Un dispositif commercial est par ailleurs disponible (Zeiss Apotome) et adaptable sur un microscope de fluorescence classique pour la microscopie dans le régime de diffraction. Dans une étude théorique et expérimentale, Chasle et al ont montré que ce dispositif était non optimal en terme de résolution axial, du fait du choix de la fréquence spatiale de la grille utilisée. Le contraste du motif d'illumination influence fortement la sensibilité de la technique (Chasles et al. 2007).

L'utilisation de l'illumination structurée que nous proposons ici s'adresse au domaine où la résolution est limitée par la diffusion multiple. Sa mise en oeuvre pour l'étude dynamique de tissus cérébraux in vivo n'a pas encore été réalisée et constitue un développement excitant pour les trois modalités : réflectance, fluorescence, contraste speckle que nous avons développées jusqu'à présent. L'un des défauts de l'imagerie en illumination structurée est la rétention d'une partie du motif sur les images reconstruites du fait d'un déphasage imparfait entre les images. Cet artefact est d'autant plus important pour les études dynamiques où la stabilisation de la grille après déplacement par un piézo-électrique peut prendre jusqu'à quelques dizaines de millisecondes. Nous proposons de développer un dispositif utilisant un modulateur spatial à commutation rapide qui dépasse cette contrainte et présente une grande flexibilité en terme de fréquence spatiale du motif utilisé. Un tel dispositif a été développé récemment par une équipe du Beckmann Laser Institute (Irvine, Etats Unis) (Weber et al. 2006). La principale originalité du dispositif est l'utilisation d'un modulateur spatial, composé d'une matrice de micro-miroirs (« digital micro mirrors » ou DMD), du même type que celui que nous utilisons dans la source spectrale à commutation rapide (cf. partie II paragraphe 3.3). Ce composant permet (i) de varier la fréquence spatiale du motif d'illumination et (ii) la commutation entre chaque position de la grille en quelques dizaines de microsecondes. Pour faire évoluer notre dispositif vers l'illumination structurée, nous devons interfacer une matrice DMD et synchroniser sa commutation avec la prise d'image. Ce travail instrumental constituera une prolongation relativement directe des dispositifs précédents puisque les mêmes outils seront utilisés (acquisition et interface sous micromanager, Labview, synchronisation par micro-contrôleur Arduino). Nous devrions aboutir courant 2013, à un dispositif multimodal en illumination structurée tel que présenté sur la figure 42.

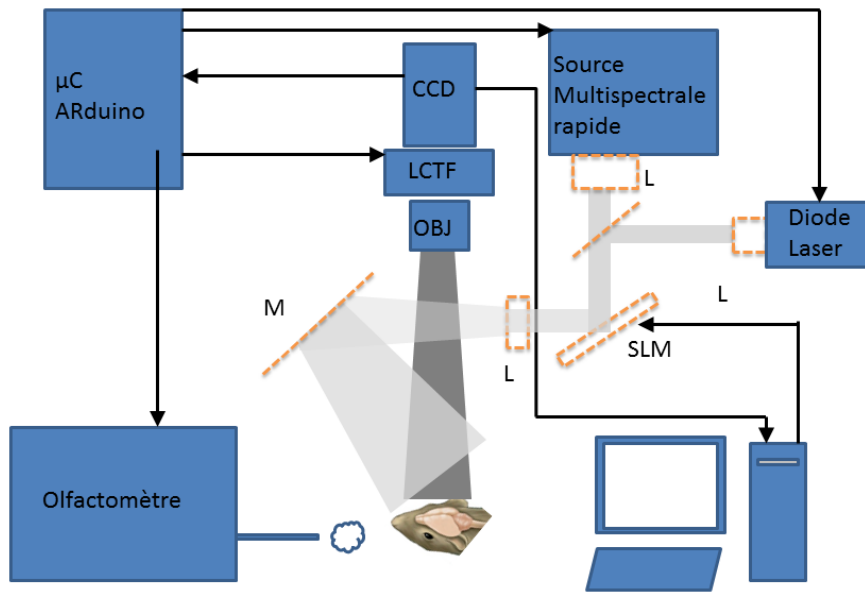


Figure 42 : Architecture du dispositif en illumination structurée. Les éléments additionnels pour l'illumination structurée sont en pointillés orange. SLM –Modulateur Spatial DMD, L –Lentille, M Miroirs, LCTF Filtre accordable à cristaux liquides.

Les enjeux de ce dispositif pour l'imagerie de l'activation cérébral en champ large sont multiples. Premièrement, la résolution axiale du dispositif pourra être sensiblement améliorée pour la cartographie en imagerie d'autofluorescence ou en imagerie calcique. La possibilité d'adapter la fréquence spatiale du motif devrait permettre de déterminer une fréquence optimale du motif d'illumination en fonction de la profondeur des structures étudiées. La preuve de concept de ce type d'optimisation tant pour la résolution spatiale que pour la sélectivité en profondeur a été obtenue pour des inclusions fluorescentes dans des fantômes diffusants (Mazhar et al. 2010). Deuxièmement, le dispositif pourrait être utilisé en ICLS pour laquelle l'illumination structurée devrait améliorer l'aspect quantitatif. En effet, une étude récente réalisée in vitro a montré que le choix de la fréquence d'illumination pourrait permettre d'une part, d'obtenir une sélectivité en profondeur du contraste speckle, d'autre part, de limiter voire d'éliminer l'influence des variations dynamiques d'absorption sur le contraste speckle (Mazhar et al. 2011). Troisièmement, l'imagerie IOSI multispectrale séquentielle réalisée séquentiellement à plusieurs fréquences spatiales du motif d'illumination permettra d'obtenir une cartographie dynamique in vivo des propriétés optiques d'absorption et de diffusion (Saager et al. 2010; Saager et al. 2011). Ce dernier point est essentiel puisqu'il nous permettra

de quantifier in vivo l'influence du signal de diffusion sur les signaux de réflectance (cf. partie II paragraphe 3.6). Si, dès les années 40 (Hill and Keynes 1949), la modification des propriétés d'absorption et de diffusion a été observée lors du passage d'un potentiel d'action sur des neurones isolés, la contribution des modifications des propriétés de diffusion aux signaux intrinsèques de réflectance enregistrés in vivo reste débattue. Cette question a fait l'objet de débats intenses, notamment avec la publication de premières données in vivo (Rector et al 2005) et n'est toujours pas tranchée. Une des implications majeures qui découle de cette question est la validité des études quantitatives menées en IOSI multispectrale. En effet, ces études reposent l'hypothèse d'une contribution minimale des variations de diffusion. Les résultats surprenants que nous avons obtenus pour les signaux hémodynamiques dans le bulbe olfactif nous ont fait reconsidérer cette question (cf. partie II paragraphe 3.6). Nous avons montré par simulation MC considérant des variations arbitraires de la diffusion que, sous certaines conditions, les variations de diffusion pouvaient modifier les profils temporels et l'amplitude des signaux hémodynamiques obtenus (données non publiées thèse de R Renaud). La détermination IOSI en illumination structurée des propriétés optiques dynamiques au cours d'une activation devrait fournir de nouvelles données sur cette question.

3 Mesures des propriétés optiques des tissus - Simulation Monte Carlo des photons sous GATE.

Parallèlement aux développements instrumentaux, je participe depuis 2010 au projet ANR hGate qui s'intéresse à la migration de la plateforme de simulations GATE (Jan et al. 2004) vers une architecture GPU. Au sein de ce projet, je participe à l'intégration des algorithmes de simulations du parcours des photons dans les milieux diffusants dans GATE. L'architecture GPU est particulièrement intéressante pour la simulation des photons visibles en milieu diffusant qui nécessite un très grand nombre d'opérations par paquet de photons (Ren et al. 2010). Des gains en temps de calculs considérables sont attendus et devraient avoir un intérêt particulier pour la planification des traitements en thérapie photodynamique du cancer (Alerstam et al. 2010) J'interagis dans ce cadre avec les informaticiens chargés du codage, pour préciser les processus physiques à prendre en compte. Nous avons également développé un système de mesure des propriétés optiques des tissus sur coupe de tissus frais dans le but d'alimenter les simulations MC avec des données d'absorption et de diffusion sur une large gamme spectrale. Ces données sont en effet rarement disponibles ou uniquement pour quelques

valeurs de longueurs d'onde (Cheong et al. 1990). La méthode de mesure la plus précise consiste à déterminer les propriétés optiques par l'ajustement d'une expression analytique de la déformation d'une impulsion brève, après son passage dans le tissu d'épaisseur connue. Cette méthode requiert un laser à impulsion de quelques ns, associé à un dispositif à comptage de photon (Arridge et al. 1992). Le dispositif que nous avons développé repose sur une approche instrumentalement plus simple. Il s'appuie sur la mesure de la transmission, réflexion et transmission collimatée d'un faisceau de lumière blanche collimatée puis par l'inversion de ces mesures macroscopiques par un algorithme rapide « Inverse Adding Doubling » (Prahl et al. 1993). Le système développé comporte une source blanche intense fibrée et collimatée pour obtenir un faisceau de 1mm, la détection est réalisée par un spectrophotomètre refroidi. Une sphère intégrante calibrée est utilisée pour les mesures de la transmittance et réflectance totale. Pour la mesure de la transmission collimatée, c'est à dire des photons balistiques non diffusés, on utilise trois diaphragmes interposés entre l'échantillon et la fibre de collection du spectrophotomètre. Pour chaque paramètre, trois spectres sont enregistrés : sans échantillon, avec échantillon et un spectre de bruit. Le système a été validé sur un fantôme solide (matrice en polyuréthane et chromophore absorbant et diffuseur) pour lequel les propriétés optiques étaient connues à 530nm et 630nm. Les mesures obtenues présentent une bonne répétabilité et une erreur relative de l'ordre 10% par rapport aux grandeurs mesurés par la méthode résolue en temps. Nous avons débuté au printemps 2012, une campagne de mesure sur tissus frais et congelés de rat. Un protocole de coupes des tissus frais au vibratome a été mis en place et a d'ores et déjà permis d'obtenir des données pour des tissus de cœur, de rein et de cerveau (figure 43). Ces données préliminaires sont cohérentes avec les quelques données disponibles dans la littérature et constituent un résultat très encourageant puisque, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée pour ces tissus sur l'ensemble de cette gamme de longueur d'onde. Nous avons débuté l'étude de la variabilité intra-individuelle en considérant pour chaque organe, 12 points de mesures. Cette variabilité semble sensiblement plus importante pour le cerveau, structure plus hétérogène que pour le rein et le cœur. Nous prévoyons d'étudier la variabilité inter-individuelle en reproduisant ces études sur plusieurs animaux. Par ailleurs, l'effet de la congélation sera également évalué à l'aide de coupes de 200 microns obtenues au cryostat. A ce jour, très peu d'études sont disponibles sur le sujet. L'ambition de ce projet de métrologie, à l'instrumentation simple est de proposer une référence pour les propriétés optiques de diffusion et d'absorption, pour les principaux organes, dans le visible et le proche infrarouge. Enfin, nous évaluerons également sur les mêmes coupes de tissus frais l'autofluorescence pour différentes longueurs d'onde d'excitation. Ces informations a priori basiques sont peu documentées. Elles

manquent actuellement à la communauté de l'imagerie optique bio-photonique et devrait permettre d'améliorer le réalisme des prédictions des simulations MC.

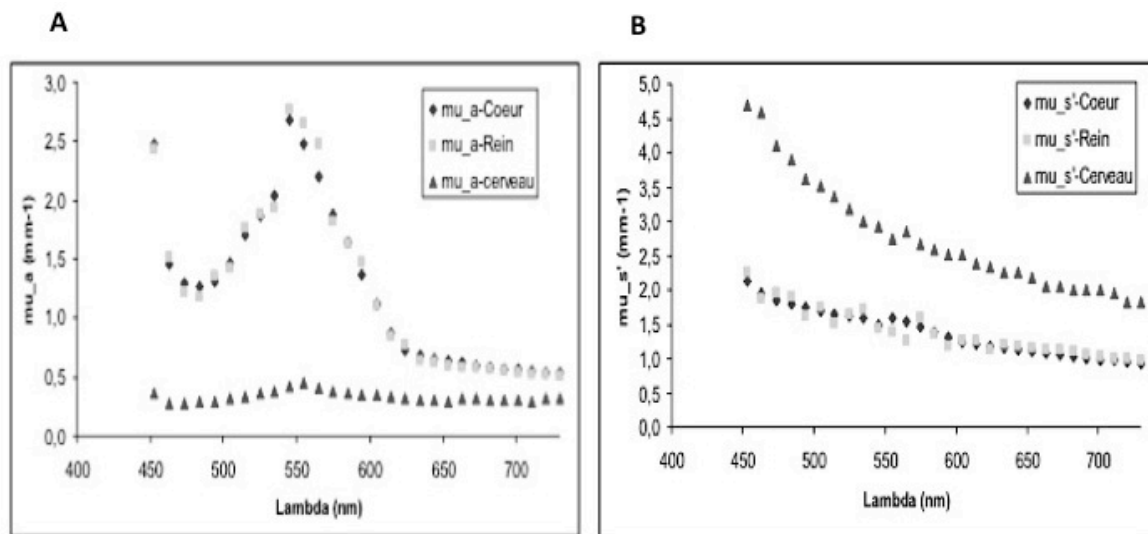


Figure 43. Propriétés optiques des tissus frais de rat. A) Coefficients d'absorption pour le rein, le cœur et le cerveau B) Coefficients de diffusion pour le rein, le cœur et le cerveau (Moyenne sur 8 points de mesure sur un seul animal)

4. Microscopie non linéaire in vivo

Dans les années qui viennent, je souhaite développer mes compétences instrumentales et mes projets de recherches dans le domaine de la microscopie optique non linéaire. En effet, les études que nous avons menées au laboratoire IMNC en imagerie en champ large permettent l'imagerie dynamique d'une structure cérébrale limitée à sa surface. Les techniques développées fournissent des cartographies dynamiques à l'échelle des modules fonctionnels avec des résolutions latérales et axiales de plusieurs dizaines de microns. Ces données gagneraient à être complétées par des études à la résolution cellulaire. Cependant, l'étude du couplage neurovasculaire et neurorénergétique sur le modèle de l'activation du bulbe olfactif est menée en France avec d'excellents résultats par l'équipe de S Charpak (Chaigneau et al. 2007; Lecoq et al. 2009, 2011). Cette équipe a notamment mis au point l'imagerie du débit sanguin dans le bulbe depuis les artérioles et les capillaires de la couches glomérulaire jusqu'au vénules (Chaigneau et al. 2003). Par ailleurs, l'imagerie des signaux calciques et de la consommation d'oxygène par décroissance de phosphorescence d'un traceur adapté aux études in vivo en imagerie non linéaire ont été démontrés (Lecoq et al. 2011). Au vu de notre inexpérience, des travaux déjà réalisés, et de la forte concurrence dans ce domaine, nous avons initialement décidé, avec H Gurden, de nous concentrer sur les techniques en champ large, tout en

conservant l'idée d'utiliser la microscopie de fluorescence à deux photons devenue l'un des outils essentiels pour la recherche en neurosciences.

L'opportunité d'utiliser et développer ce type de microscopie est apparue à la suite de deux événements : le recrutement au laboratoire de Darine Abi Haidar, qui possède des compétences et une expérience solide en instrumentation en optique non linéaire et en microscopie à deux photons et, la mise à la disposition du laboratoire IMNC à partir de fin 2011, d'un microscope bi-photonique de 1^{ère} génération jusqu'alors non inutilisé dans sa fonctionnalité non linéaire, faute de compétences instrumentales dans un laboratoire voisin (L Combettes, Inserm UMR S 757, Orsay). Nous avons alors initié des développements selon deux axes :

- Le premier s'intéresse à l'étude par microscopie deux photons de structures cérébrales très profondes, en implantant dans les tissus un objectif relai comme une lentille à gradient d'indice (GRIN) de faibles dimensions,
- Le second a pour objectif le développement d'un endomicroscope fibré adapté à l'imagerie optique non linéaire.

4.1 Microscopie optique non linéaire des tissus profonds

L'utilisation d'un objectif relai implanté permet d'atteindre les tissus profonds inaccessible à la microscopie non invasive. Cette technique s'appuie sur l'utilisation de lentilles GRIN dont le diamètre peut être aussi petit que 300 microns (Jung et al. 2004). Cette technique développée par quelques groupes essentiellement aux Etats Unis depuis le milieu des années 2000 (Levene et al. 2004; Jung et al. 2004), a été peu utilisée au delà d'études de preuves de principes. Elle n'a jusqu'à présent jamais été utilisée pour l'imagerie des cortex sensoriels lors d'une activation. A l'aide d'un financement interne des deux laboratoires concernés, nous avons remis en état de fonctionnement le laser femtoseconde disponible (Spectra Physics Tsunami) et l'ensemble du dispositif de balayage. Nous avons alors commencé la caractérisation de doublet de lentilles GRIN pour l'imagerie optique non linéaire tant expérimentalement que par simulation optique sous Zemax (stage de M2 de Hussein Hamzeh). Nous avons mis en évidence l'absence de modifications significatives des impulsions après passage dans le doublet GRIN, tant du point de vue temporel que spectral. Les simulations ont permis d'étudier les aberrations optiques en particulier les aberrations sphériques et chromatiques susceptibles de dégrader la résolution spatiale et perturber la collection des signaux de fluorescence. De nouveaux objectifs

composés d'une seule lentille GRIN ont été proposés récemment pour minimiser ces aberrations (Murray & Levene 2012). Actuellement, nous construisons le dispositif qui permettra de venir balayer le plan arrière de la lentille après son implantation dans les tissus sous chirurgie stéréotaxique. Outre le bulbe olfactif, la structure à laquelle nous nous intéresserons est le cortex piriforme qui constitue l'étape d'intégration des stimuli olfactifs et est situé à environ 1 cm sous la surface du cerveau. Il est donc inatteignable avec les protocoles classiques, y compris en microscopie non linéaire puisque les profondeurs raisonnablement atteintes n'excèdent pas 1mm au maximum. En l'absence de données autres qu'électrophysiologiques dans le cortex piriforme, les questions biologiques sont nombreuses :

- les signaux dans le cortex piriforme sont ils dépendants du stimulus?
- une carte d'activation spécifique de l'odeur existe telle dans le cortex piriforme ?
- si cette carte existe quelle est sa corrélation avec les cartes obtenues pour la même odeur dans la couche glomérulaire ?
- quel est le profil temporel des signaux tant vasculaires que de fluorescence calcique enregistrés dans le cortex piriforme ?
- Comment ce profil temporel est il corrélé à celui des signaux observés dans le bulbe ?

En parallèle à ces développements, nous avons débuté une collaboration avec l'institut Langevin pour étudier l'activation cérébrale par une nouvelle méthode d'imagerie fonctionnelle utilisant les ondes ultrasonores. Cette technique qui possède une résolution spatiale de l'ordre du mm³ et temporelle de l'ordre de la seconde, permet de visualiser les signaux hémodynamiques en profondeur et sur un champ large. Des données préliminaires ont été obtenues pour différentes odeurs, différentes intensités et différentes durées de stimulations dans le bulbe olfactif et le cortex piriforme. Il sera extrêmement intéressant de comparer les données hémodynamiques obtenue en imagerie ultrasonores et les données obtenues en imagerie deux photons tant pour les signaux hémodynamiques que pour les signaux de fluorescence endogène et exogène.

4.2 Endomicroscopie pour la biopsie optique

Le second axe dans lequel je vais fortement m'impliquer dans les années à venir est la mise en œuvre de la microscopie non linéaire dans sa géométrie fibrée pour des mesures endomicroscopiques. La motivation de ce projet est de mettre à disposition des chirurgiens et

anatomopathologistes un outil de discrimination et de classification des tissus cancéreux cérébraux. Actuellement, ces analyses sont faites par fixation / coloration des tissus prélevés par biopsie lors des examens exploratoires. Ces protocoles présentent plusieurs inconvénients : ils imposent plusieurs prélèvements de tissus et nécessitent un délai de plusieurs jours entre le prélèvement et l'analyse. La possibilité de réaliser des images in situ à la résolution cellulaire ou sub-cellulaire et l'utilisation de différents modes de contraste optique devrait permettre (i) une mesure du tissu dans son environnement, ce qui du point de vue fonctionnel est essentiel ; (ii) une biopsie optique sans prélèvement donc moins invasive (iii) une biopsie sans coloration/fixation, dont le résultat est obtenu en temps réel (iv) une imagerie multimodale combinant contrastes « anatomique » et « fonctionnels ».

Cette approche qui débute au niveau international (pour une revue on se reportera à Fu et Gu 2007) pourrait à terme modifier les protocoles chirurgicaux actuels qui consistent, en une série de biopsies exploratoires après une IRM, suivie de l'analyse anatomopathologique. C'est à l'analyse des résultats, dans les jours qui suivent la biopsie que le diagnostic est posé et que la voie thérapeutique est décidée. L'imagerie endo-microscopique en temps réel pourrait conduire à un diagnostic lors de la biopsie, suivi d'une mise en place immédiate des actions thérapeutiques adaptées. Les enjeux sont donc doubles : d'une part diminuer le nombre et la durée des sessions d'imagerie ou de chirurgie, d'autre part, affiner la classification de certains cancers à l'aide de la combinaison de source de contraste multiple.

Nous venons d'obtenir un important financement (Physicancer Plan Cancer 2012-2013) pour ce projet qui présente des défis instrumentaux importants. L'objectif est de développer rapidement un dispositif multimodal associant imagerie de fluorescence, spectroscopie, et imagerie de temps de vie de fluorescence. La multimodalité est essentielle car les techniques monomodales développées pour le diagnostic du cancer tant en imagerie en champ large qu'en endoscopie ont jusqu'à présent buté sur une spécificité et une sélectivité plus faible en comparaison des techniques histo-pathologiques. Des études récentes montrent l'intérêt de l'association de techniques dont la combinaison permet une analyse discriminante et la classification des tissus (Meyer et al. 2011).

Pour les points techniques les plus délicats de ce projet, nous avons établi des collaborations avec des groupes de recherche ou des sociétés qui possèdent l'expertise requise. Les points techniques clés sont maintenant résumés. Comme indiqué sur la figure 44, le

dispositif est constitué d'une fibre optique unique à double cœur qui assure l'excitation et la collection de la lumière (Fu et Gu 2006; Rivera et al. 2011). La précompensation avant injection d'une impulsion infrarouge ultra courte dans une fibre optique est nécessaire afin d'obtenir en sortie de fibre une impulsion ayant les caractéristiques temporelles, spectrales et la puissance requises. Nous bénéficierons pour ce de la collaboration avec le laboratoire XLIM (F. Louradour, Limoges) qui a déjà développé et validé de telles lignes de compensation à hautes performances (Lefort et al. 2011; Peyrot et al. 2012) dont l'une a été mise en œuvre par Darine Abi Haidar. Pour la focalisation de la lumière en sortie de fibre, nous utiliserons des lentilles GRIN adaptées aux longueurs d'onde utilisées en microscopie deux photons (Fu et al. 2005). Le système de balayage pour une fibre unique est sans doute l'élément nécessitant le plus de développement pour notre système. Pour cela, nous nous orientons vers l'utilisation d'un tube piezzo miniature à quatre quadrants dont l'utilisation a été validée pour cette application avec des champs de vue et des cadences d'imagerie acceptables (Myaing et al. 2006). La mesure de durée de vie et le spectre des signaux seront obtenus via un système existant au laboratoire (TimeHarp, Picoquant) et qui constituera une des voies de détection de l'endo-microscope. Pour les canaux de détections, des photomultiplicateurs associés à une carte d'acquisition rapide seront utilisés. La synchronisation du balayage et de l'acquisition des différents canaux, imposera le développement d'une électronique rapide et d'un logiciel dédié qui seront en partie réalisés par le service instrumentation du laboratoire IMNC. Nous avons établi une collaboration avec les services de neurochirurgie et d'anatomopathologie de l'hôpital Saint Anne (Dr Devaux, P Verlet). Un protocole de collecte des échantillons frais de tissus sains et cancéreux a été établi. Ces échantillons seront analysés à l'aide d'un microscope deux photons classique et le système de mesure de durée de vie et de spectre de fluorescence. L'objectif de cette étude est de déterminer une signature optique pour discriminer les tissus cancéreux des tissus sains et, au delà, de classifier les tumeurs. Ce point est une condition essentielle à la réussite du projet. S'il s'avère que l'hétérogénéité des tumeurs et la variabilité des signaux rend cette analyse délicate, nous pourrions avoir recours à l'utilisation de précurseurs des fluorophores endogènes, en particulier l'acide 5 aminolévulinique (5-ALA), qui est un précurseur de la protoporphyrine IX (PpIX) et dont la spécificité de l'accumulation dans certaines tumeurs cérébrales a été montrée, y compris en clinique (Valdés et al. 2011). La sélectivité et la spécificité des analyses utilisant différentes combinaisons de contraste seront évaluées par rapport aux données d'histo-photologie obtenues sur les mêmes échantillons après coloration standard. Sur la base de ces études, nous utiliserons le système pour étudier in vivo le cerveau de rats sains et portants des cellules tumorales humaines, ces modèles étant

actuellement mis en œuvre au laboratoire pour la modélisation de la migration cellulaire (lignées C6, RG2).

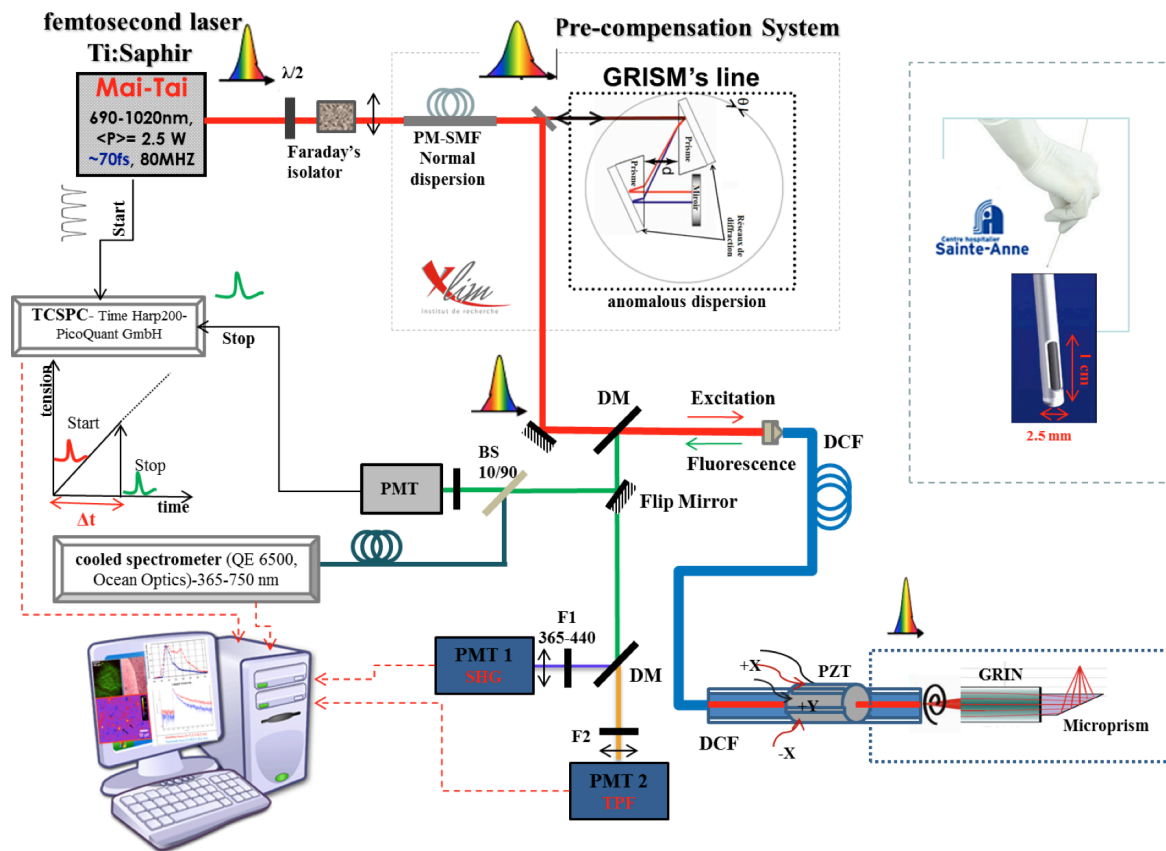


Figure 44 Architecture du microendoscope multimodal proposé. En rouge la voie d'excitation fibrée associant une source laser Mia tai, un module de précompensation de la dispersion et une fibre à double clad (DCF). Plusieurs voies de détections seront interrogées séquentiellement : imagerie de fluorescence ou du signal de seconde harmonique (PMT1et PMT2), Spectroscopie ou imagerie de temps de vie de fluorescence (spectro-photomètre refroidi et PMT associé à une carte à comptage de photon résolue en temps). Le dispositif est insérer dans un trocard à biopsie. PZT transducteur piézo-électrique. DCF Fibre à double clad. PMT Photomultiplicateur DM Miroir dichroic BS Séparateur de faisceau.

Conclusion générale

Dans ce document j'ai tenté de présenter un bilan de mes activités de recherche des dix dernières années et de mes projets en cours et à venir. La ligne directrice commune de toutes ces activités est le développement de techniques et de méthodologies pour les études cérébrales in vivo sur modèles animaux. Mes travaux initiaux avec la sonde SIC s'intéressaient à la détection de radio-traceurs puis j'ai recentré mes activités sur les techniques d'imagerie optiques en champ large et, plus récemment, les techniques de microscopie non linéaire. Ces travaux ont été menés en équipe puisque des

compétences en instrumentation, biologie ou médecine ont été mises en œuvre simultanément sur les différents projets. Au sein du laboratoire, j'ai travaillé pour la partie isotopique, en binôme avec Philippe Lanièce pendant plusieurs années. Lorsque j'ai souhaité prendre une part d'autonomie et m'orienter vers les techniques optiques, la thématique des sondes intracérébrales radiosensibles a continué au laboratoire IMNC avec le projet PIXSIC. Bien que j'y sois peu impliqué techniquement, je continue de suivre ces développements qui ont aboutis récemment à la validation expérimentale *in vivo* d'une sonde pixelisée composée d'un détecteur radiosensible en silicium. Pour la partie optique, comme je l'ai déjà écrit dans ce document, la collaboration avec Hiram Gurden a été extrêmement stimulante. Avec nos travaux autour de l'activation neuro-métabolique, je pense avoir atteint un niveau de collaboration à l'interface instrumentation / biologie beaucoup plus abouti que sur mes travaux isotopiques. En effet, sans abandonner nos compétences respectives en neurobiologie et instrumentation, nous avons mutuellement nourri nos réflexions sur les origines physico-biologiques des signaux optiques tant en imagerie intrinsèque qu'en imagerie d'autofluorescence. Les outils développés (instruments et simulation) ont fournis des données originales sur différentes thématiques en neurobiologie (olfaction et nutrition, M Bendhamane, thèse soutenue en 2011 ; apprentissage et plasticité dans le bulbe olfactif, R Chery, thèse soutenue en 2012). Enfin, les nouvelles questions soulevées par les résultats observés en imagerie multispectrale vont donner lieu à de nouveaux développements instrumentaux excitants. Comme cela a été malicieusement souligné dans une récente revue, le futur de l'imagerie optique pour les études du couplage neurovasculaire et neuro-métabolique est lumineux (Devor et al 2012). Je débute actuellement une troisième phase de mes activités de recherche avec la création d'une équipe et l'ouverture d'un nouvel axe en microscopie non linéaire *in vivo*. La création de l'équipe Imagerie Biophotonique *In vivo* (IBIV) concrétise l'arrivée au laboratoire de deux jeunes chercheurs instrumentalistes spécialisés en microscopie optique non linéaire. Nous allons mener ensemble des projets ambitieux mais réalistes tant en imagerie en champ large que pour les développements en microscopie non linéaire. Si les aspects que nous allons aborder en oncologie ne me sont pas familiers, les problématiques autour du métabolisme énergétique constitue une bonne base de travail puisque les signatures optiques des tissus cancéreux trouvent souvent leur origine dans l'hyper-métabolisme des tissus cancéreux. Ainsi, il existe un lien fort et cohérent entre les techniques d'études du couplage neurovasculaire et neuro-énergétiques et les signaux optiques potentiellement utiles pour discriminer et caractériser les tissus cancéreux.

Pour conclure, et puisque l'HDR permet l'encadrement officiel de doctorants, je voudrai souligner le rôle majeur des étudiants, stagiaires et doctorants dans l'avancement de mes projets. Il est clair que la recherche conduite par un enseignant-chercheur est largement portée par les étudiants qu'il encadre. Cela est d'autant plus vrai sur les thématiques expérimentales où leur investissement quotidien sur les bancs expérimentaux est indispensable à l'avancement des travaux. La double fonction d'enseignant et de chercheur permet une approche globale qui peut être très stimulante pour les encadrants car elle recouvre l'encadrement des étudiants depuis les approches académiques jusqu'à la

planification des projets, la résolution des problèmes techniques au quotidien et la discussion des résultats.

Bibliographie

Aguirre A.D. et al., 2006. Depth-resolved imaging of functional activation in the rat cerebral cortex using optical coherence tomography. *Optics letters*, 31(23), p.3459-3461.

Alerstam E., et al., 2010. Next-generation acceleration and code optimization for light transport in turbid media using GPUs. *Biomedical optics express*, 1(2), p.658-675.

Antal A., Toldi, J., 1989. Cortical potentials evoked by mechanical stimulation of different number of vibrissae of the rat. *Acta biologica Hungarica*, 40(4), p.343-353.

- Arridge S.R., Cope, M. & Delpy, D.T., 1992. The theoretical basis for the determination of optical pathlengths in tissue: temporal and frequency analysis. *Physics in medicine and biology*, 37(7), p.1531-1560.
- Axelrad H., Verley, R. & Farkas, E., 1976. Responses evoked in mouse and rat SI cortex by vibrissa stimulation. *Neuroscience letters*, 3(5-6), p.265-274.
- Aznavour N. et al., 2006. A PET imaging study of 5-HT(1A) receptors in cat brain after acute and chronic fluoxetine treatment. *NeuroImage*, 33(3), p.834-842.
- Barlow A.L. & Guerin, C.J., 2007. Quantization of widefield fluorescence images using structured illumination and image analysis software. *Microscopy research and technique*, 70(1), p.76-84.
- Le Bars D. et al., 1998. High-yield radiosynthesis and preliminary in vivo evaluation of p-[18F]MPPF, a fluoro analog of WAY-100635. *Nuclear medicine and biology*, 25(4), p.343-350.
- Boas D., Dunn A.K., 2010. Laser speckle contrast imaging in biomedical optics. *Journal of biomedical optics*, 15(1), p.011109.
- Bonhoeffer T. & Grinvald, A., 1991. Iso-orientation domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns. *Nature*, 353(6343), p.429-431.
- Bouchard M.B. et al., 2009. Ultra-fast multispectral optical imaging of cortical oxygenation, blood flow, and intracellular calcium dynamics. *Optics express*, 17(18), p.15670-15678.
- Bradley R.S. & Thorniley, M.S., 2006. A review of attenuation correction techniques for tissue fluorescence. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 3(6), p.1-13.
- Chaigneau E. et al., 2007. The relationship between blood flow and neuronal activity in the rodent olfactory bulb. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(24), p.6452-6460.
- Chaigneau, E. et al., 2003. Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), p.13081-13086.
- Chance B., Legallais V., Schoner B., 1962. Metabolically linked changes in fluorescence emission spectra of cortex of rat brain, kidney and adrenal gland. *Nature*, 195, p.1073-1075.
- Chasles F., Dubertret, B., Boccara, A.C., 2007. Optimization and characterization of a structured illumination microscope. *Optics express*, 15(24), p.16130-16140.
- Chen Yu et al. 2009. Optical coherence tomography (OCT) reveals depth-resolved dynamics during functional brain activation. *Journal of neuroscience methods*, 178(1), p.162-173.
- Cheong W.F., Prahl, S.A., Welch, A.J., 1990. A review of the optical properties of biological tissues. *Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 26(12), p.2166 -2185.
- Cherry S.R. et al. 1997. MicroPET: a high resolution PET scanner for imaging small animals. *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, 44(3), p.1161 -1166.

- Chery R et al., 2011. Imaging odor-evoked activities in the mouse olfactory bulb using optical reflectance and autofluorescence signals. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (56), p.e3336.
- Cohen L B, Hille B., Keynes, R.D., 1970. Changes in axon birefringence during the action potential. *The Journal of physiology*, 211(2), p.495-515.
- Contag C.H. et al., 1997. Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochemistry and photobiology*, 66(4), p.523-531.
- Convert L., et al. 2007. A new tool for molecular imaging: the microvolumetric beta blood counter. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 48(7), p.1197-1206.
- Daghighian F., et al., 1994. Intraoperative beta probe: a device for detecting tissue labeled with positron or electron emitting isotopes during surgery. *Medical physics*, 21(1), p.153-157.
- Desbrée A., et al., 2007. Simultaneous in vivo magnetic resonance imaging and radioactive measurements with the beta-MicroProbe. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 34(11), p.1868-1872.
- Desbrée A., et al., 2004. Combining the radiosensitive Beta MicroProbe to nuclear magnetic resonance: theoretical approach for in vivo studies in small animals. *Journal of neuroscience methods*, 140(1-2), p.47-52.
- Desbrée A., et al., 2008. The potential of a radiosensitive intracerebral probe to monitor 18F-MPPF binding in mouse hippocampus in vivo. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 49(7), p.1155-1161.
- Devor A. et al., 2003. Coupling of total hemoglobin concentration, oxygenation, and neural activity in rat somatosensory cortex. *Neuron*, 39(2), p.353-359.
- Devor, A. et al. Frontiers in optical imaging of cerebral blood flow and metabolism. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1259–1276 (2012).
- Duncan D.D., Kirkpatrick S.J., 2008. Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool? *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*, 25(8), p.2088-2094.
- Dunn A.K. et al., 2005. Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex. *NeuroImage*, 27(2), p.279-290.
- Elwell C.E. et al., 1993. Measurement of adult cerebral haemodynamics using near infrared spectroscopy. *Acta neurochirurgica. Supplementum*, 59, p.74-80.
- Fayuk D. et al., 2002. Two different mechanisms underlie reversible, intrinsic optical signals in rat hippocampal slices. *Journal of neurophysiology*, 87(4), p.1924-1937.
- Feinstein P., Mombaerts, Peter, 2004. A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell*, 117(6), p.817-831.
- Fu L., Gu M., 2007. Fibre-optic nonlinear optical microscopy and endoscopy. *Journal of microscopy*, 226(Pt 3),

p.195-206.

Fu L., Gan X., Gu M., 2005. Characterization of gradient-index lens-fiber spacing toward applications in two-photon fluorescence endoscopy. *Applied optics*, 44(34), p.7270-7274.

Fu L., Gu M., 2006. Double-clad photonic crystal fiber coupler for compact nonlinear optical microscopy imaging. *Optics letters*, 31(10), p.1471-1473.

Grinvald A. et al., 1991. High-resolution optical imaging of functional brain architecture in the awake monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), p.11559-11563.

Gurden H, Uchida N., Mainen Z.F., 2006. Sensory-evoked intrinsic optical signals in the olfactory bulb are coupled to glutamate release and uptake. *Neuron*, 52(2), p.335-345.

Harrison R.V. et al., 2002. Blood Capillary Distribution Correlates with Hemodynamic-based Functional Imaging in Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex*, 12(3), p.225-233.

Henry P.-G. et al., 2002. Decreased TCA cycle rate in the rat brain after acute 3-NP treatment measured by in vivo ¹H-[¹³C] NMR spectroscopy. *Journal of neurochemistry*, 82(4), p.857-866.

Herschman H.R. et al., 2000. Seeing is believing: non-invasive, quantitative and repetitive imaging of reporter gene expression in living animals, using positron emission tomography. *Journal of neuroscience research*, 59(6), p.699-705.

Hill D.K. & Keynes R.D., 1949. Opacity changes in stimulated nerve. *The Journal of physiology*, 108(3), p.278-281.

Hillman E.M.C., 2007. Optical brain imaging in vivo: techniques and applications from animal to man. *Journal of biomedical optics*, 12(5), p.051402.

Homola A. et al., 2006. Changes in diffusion parameters, energy-related metabolites and glutamate in the rat cortex after transient hypoxia/ischemia. *Neuroscience letters*, 404(1-2), p.137-142.

Hume S.P. et al., 1992. Quantitation of carbon-11-labeled raclopride in rat striatum using positron emission tomography. *Synapse (New York, N.Y.)*, 12(1), p.47-54.

Iadecola C., 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(5), p.347-360.

Jan S. et al., 2004. GATE: a simulation toolkit for PET and SPECT. *Physics in medicine and biology*, 49(19), p.4543-4561.

Jung J.C. et al., 2004. In vivo mammalian brain imaging using one- and two-photon fluorescence microendoscopy. *Journal of neurophysiology*, 92(5), p.3121-3133.

Kauer J.S., 1974. Response patterns of amphibian olfactory bulb neurones to odour stimulation. *The Journal of physiology*, 243(3), p.695-715.

- Kauer J.S., Shepherd, G M, 1975. Olfactory stimulation with controlled and monitored step pulses of odor. *Brain research*, 85(1), p.108-113.
- Kießling F., 2011. *Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide*, Springer.
- Kohl M. et al., 2000. Physical model for the spectroscopic analysis of cortical intrinsic optical signals. *Physics in medicine and biology*, 45(12), p.3749-3764.
- Kossut M. et al., 1988. Single vibrissal cortical column in SI cortex of rat and its alterations in neonatal and adult vibrissa-deafferented animals: a quantitative 2DG study. *Journal of neurophysiology*, 60(2), p.829-852.
- Laforest R. et al., 2005. Measurement of input functions in rodents: challenges and solutions. *Nuclear medicine and biology*, 32(7), p.679-685.
- Langhorst M.F., Schaffer J., Goetze B., 2009. Structure brings clarity: structured illumination microscopy in cell biology. *Biotechnology journal*, 4(6), p.858-865.
- Laruelle M., 2000. Imaging synaptic neurotransmission with in vivo binding competition techniques: a critical review. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(3), p.423-451.
- Lecomte R. et al., 1996. Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph. *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, 43(3), p.1952 -1957.
- Lecoq J. et al., 2011. Simultaneous two-photon imaging of oxygen and blood flow in deep cerebral vessels. *Nature medicine*, 17(7), p.893-898.
- Lefort C. et al., 2011. Pulse compression and fiber delivery of 45 fs Fourier transform limited pulses at 830 nm. *Optics letters*, 36(2), p.292-294.
- Levene M.J. et al., 2004. In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *Journal of neurophysiology*, 91(4), p.1908-1912.
- Levin C.S., Hoffman, E.J., 1999. Calculation of positron range and its effect on the fundamental limit of positron emission tomography system spatial resolution. *Physics in Medicine and Biology*, 44(3), p.781-799.
- Lindauer U. et al., 2001. No evidence for early decrease in blood oxygenation in rat whisker cortex in response to functional activation. *NeuroImage*, 13(6 Pt 1), p.988-1001.
- Lloyd-Fox S., Blasi, A. & Elwell, C.E., 2010. Illuminating the developing brain: the past, present and future of functional near infrared spectroscopy. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 34(3), p.269-284.
- Logothetis N.K. et al., 2001. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature*, 412(6843), p.150-157.
- Malonek D. et al., 1997. Vascular imprints of neuronal activity: relationships between the dynamics of cortical blood flow, oxygenation, and volume changes following sensory stimulation. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 94(26), p.14826-14831.

Mayhew J. et al., 2000a. Spectroscopic analysis of neural activity in brain: increased oxygen consumption following activation of barrel cortex. *NeuroImage*, 12(6), p.664-675.

Mazhar A. et al., 2011. Laser speckle imaging in the spatial frequency domain. *Biomedical optics express*, 2(6), p.1553-1563.

Mazhar A. et al., 2010. Structured illumination enhances resolution and contrast in thick tissue fluorescence imaging. *Journal of biomedical optics*, 15(1), p.010506.

McCasland J.S., Woolsey, T.A., 1988. High-resolution 2-deoxyglucose mapping of functional cortical columns in mouse barrel cortex. *The Journal of comparative neurology*, 278(4), p.555-569.

Meister M. & Bonhoeffer, T., 2001. Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(4), p.1351-1360.

Meyer, T. et al., 2011. Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis. *Journal of biomedical optics*, 16(2), p.021113.

Mombaerts P, 1999. Odorant receptor genes in humans. *Current opinion in genetics & development*, 9(3), p.315-320.

Murakami H. et al., 2004. Short-term plasticity visualized with flavoprotein autofluorescence in the somatosensory cortex of anaesthetized rats. *The European journal of neuroscience*, 19(5), p.1352-1360.

Murray T.A. & Levene, M.J., 2012. Singlet gradient index lens for deep in vivo multiphoton microscopy. *Journal of biomedical optics*, 17(2), p.021106.

Myaing M.T., MacDonald, D.J. & Li, X., 2006. Fiber-optic scanning two-photon fluorescence endoscope. *Optics letters*, 31(8), p.1076-1078.

Nawroth J.C. et al., 2007. An energy budget for the olfactory glomerulus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(36), p.9790-9800.

Neil M.A., Juskaitis, R. & Wilson, T., 1997. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Optics letters*, 22(24), p.1905-1907.

Pain F. et al., 2000. SIC, an intracerebral radiosensitive probe for in vivo neuropharmacology investigations in small laboratory animals: theoretical considerations and practical characteristics. *Nuclear Science, IEEE Transactions on Nuclear Science*, 47(1), p.25 -32.

Pain F. et al., 2002. SIC: an intracerebral radiosensitive probe for in vivo neuropharmacology investigations in small laboratory animals: prototype design, characterization, and in vivo evaluation. *Nuclear Science, IEEE Transactions on Nuclear Science*, 49(3), p.822 - 826.

Pain F., et al. (2002) "In vivo quantification of localized neuronal activation and inhibition in the rat brain using a dedicated high temporal resolution B-sensitive microprobe" *PNAS*; 99, 10807-10812.

Pain F, et al. (2004) "Arterial input function measurement without blood sampling using a B Microprobe in rats." *Journal of Nuclear Medicine* ;45, 1577-1582.

- Pain F et al., 2008. A method based on Monte Carlo simulations and voxelized anatomical atlases to evaluate and correct uncertainties on radiotracer accumulation quantitation in beta microprobe studies in the rat brain. *Physics in medicine and biology*, 53(19), p.5385-5404.
- Paulus M.J. et al., 2000. High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2(1-2), p.62-70.
- Petersen C.C.H., 2003. The barrel cortex--integrating molecular, cellular and systems physiology. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 447(2), p.126-134.
- Petzold G.C. et al., 2008. Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron*, 58(6), p.897-910.
- Petzold G.C. & Murthy, V.N., 2011. Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron*, 71(5), p.782-797.
- Peyrot D.A. et al., 2012. Development of a nonlinear fiber-optic spectrometer for human lung tissue exploration. *Biomedical optics express*, 3(5), p.840-853.
- Plenevaux A et al., 2000. [(18F)]p-MPPF: aA radiolabeled antagonist for the study of 5-HT(1A) receptors with PET. *Nuclear medicine and biology*, 27(5), p.467-471.
- Prahl S.A., van Gemert, M.J. & Welch, A.J., 1993. Determining the optical properties of turbid mediaby using the adding-doubling method. *Applied optics*, 32(4), p.559-568.
- Prakash N. et al., 2007. Temporal profiles and 2-dimensional oxy-, deoxy-, and total-hemoglobin somatosensory maps in rat versus mouse cortex. *NeuroImage*, 37 Suppl 1, p.S27-36.
- Rbah Latifa, Leviel, Vincent & Zimmer, Luc, 2003. Displacement of the PET ligand 18F-MPPF by the electrically evoked serotonin release in the rat hippocampus. *Synapse (New York, N.Y.)*, 49(4), p.239-245.
- Rector, D.M. et al., 2005. Spatio-temporal mapping of rat whisker barrels with fast scattered light signals. *NeuroImage*, 26(2), p.619-627
- Rehemtulla A. et al., 2000. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2(6), p.491-495.
- Reinert K.C. et al., 2011. Cellular and metabolic origins of flavoprotein autofluorescence in the cerebellar cortex in vivo. *Cerebellum (London, England)*, 10(3), p.585-599.
- Ren N. et al., 2010. GPU-based Monte Carlo simulation for light propagation in complex heterogeneous tissues. *Optics express*, 18(7), p.6811-6823.
- Renaud R. et al., 2011. Multispectral imaging of the olfactory bulb activation: influence of realistic differential pathlength correction factors on the derivation of oxygenation and total hemoglobin concentration maps. *Proceedings of SPIE*, 7902(1), p.790208-790208-12
- Renaud R., et al., 2012. Multispectral reflectance imaging of brain activation in rodents: methodological study of the differential path length estimations and first in vivo recordings in the rat olfactory bulb. *Journal of biomedical optics*, 17(1), p.016012.

- Renaud R. et al., 2012. Optimization of wavelengths sets for multispectral reflectance imaging of rat olfactory bulb activation in vivo. *Proceedings of SPIE*, 8427(1), p.84271O-84271O-12.
- Riad M. et al., 2004. Acute treatment with the antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT_{1A} autoreceptors and reduces the in vivo binding of the PET radioligand [18F]MPPF in the nucleus raphe dorsalis of rat. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(23), p.5420-5426.
- Rivera D.R. et al., 2011. Compact and flexible raster scanning multiphoton endoscope capable of imaging unstained tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43), p.17598-17603.
- Rubin B.D., Katz, L.C., 1999. Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*, 23(3), p.499-511.
- Saager R.B. et al., 2011. Method for depth-resolved quantitation of optical properties in layered media using spatially modulated quantitative spectroscopy. *Journal of biomedical optics*, 16(7), p.077002.
- Saager R.B., Cuccia, D.J. & Durkin, A.J., 2010. Determination of optical properties of turbid media spanning visible and near-infrared regimes via spatially modulated quantitative spectroscopy. *Journal of biomedical optics*, 15(1), p.017012.
- Sakaguchi K. et al., 2007. Experimental prediction of the wavelength-dependent path-length factor for optical intrinsic signal analysis. *Applied optics*, 46(14), p.2769-2777.
- Seeman P. et al., 1989. Link between D1 and D2 dopamine receptors is reduced in schizophrenia and Huntington diseased brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24), p.10156-10160.
- Sheth S.A. et al., 2009. Validation and visualization of two-dimensional optical spectroscopic imaging of cerebral hemodynamics. *NeuroImage*, 47 Suppl 2, p.T36-43.
- Shibuki K. et al., 2003. Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *The Journal of physiology*, 549(Pt 3), p.919-927.
- Shimoji K. et al., 2004. Measurement of cerebral glucose metabolic rates in the anesthetized rat by dynamic scanning with 18F-FDG, the ATLAS small animal PET scanner, and arterial blood sampling. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 45(4), p.665-672.
- Strangman G., Franceschini, M.A. & Boas, David A, 2003. Factors affecting the accuracy of near-infrared spectroscopy concentration calculations for focal changes in oxygenation parameters. *NeuroImage*, 18(4), p.865-879.
- Sun X. et al., 2011. Simultaneous monitoring of intracellular pH changes and hemodynamic response during cortical spreading depression by fluorescence-corrected multimodal optical imaging. *NeuroImage*, 57(3), p.873-884.

- Sweeney T.J. et al., 1999. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), p.12044-12049.
- Thomsen K., Offenhauser, N. & Lauritzen, M., 2004. Principal neuron spiking: neither necessary nor sufficient for cerebral blood flow in rat cerebellum. *The Journal of physiology*, 560(Pt 1), p.181-189.
- Tian P. et al., 2010. Cortical depth-specific microvascular dilation underlies laminar differences in blood oxygenation level-dependent functional MRI signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), p.15246-15251.
- Tian P. et al., 2011. Monte Carlo simulation of the spatial resolution and depth sensitivity of two-dimensional optical imaging of the brain. *Journal of biomedical optics*, 16(1), p.016006.
- Tohmi M. et al., 2006. Enduring critical period plasticity visualized by transcranial flavoprotein imaging in mouse primary visual cortex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(45), p.11775-11785.
- Uchida N. et al., 2000. Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nature neuroscience*, 3(10), p.1035-1043.
- Uludag K. et al., 2002. Cross talk in the Lambert-Beer calculation for near-infrared wavelengths estimated by Monte Carlo simulations. *Journal of biomedical optics*, 7(1), p.51-59.
- Uludağ K. et al., 2004. Separability and cross talk: optimizing dual wavelength combinations for near-infrared spectroscopy of the adult head. *NeuroImage*, 22(2), p.583-589.
- Valdés P.A. et al., 2011. Combined fluorescence and reflectance spectroscopy for in vivo quantification of cancer biomarkers in low- and high-grade glioma surgery. *Journal of biomedical optics*, 16(11), p.116007.
- Wachowiak M & Cohen, L B, 2001. Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb. *Neuron*, 32(4), p.723-735.
- Wachowiak Matt & Cohen, Lawrence B, 2003. Correspondence between odorant-evoked patterns of receptor neuron input and intrinsic optical signals in the mouse olfactory bulb. *Journal of neurophysiology*, 89(3), p.1623-1639.
- Wang L., Jacques, S.L. & Zheng, L., 1995. MCML--Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer methods and programs in biomedicine*, 47(2), p.131-146.
- Warnock G. et al., 2011. Use of a beta microprobe system to measure arterial input function in PET via an arteriovenous shunt in rats. *EJNMMI research*, 1(1), p.13.
- Weber B. et al., 2002. A femoral arteriovenous shunt facilitates arterial whole blood sampling in animals. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 29(3), p.319-323.
- Weber J.R., Cuccia, D.J. & Tromberg, B.J., 2006. Modulated imaging in layered media. *Conference proceedings: ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering*

in Medicine and Biology Society. Conference, Suppl, p.6674-6676.

Woolsey T.A. et al., 1996. Neuronal units linked to microvascular modules in cerebral cortex: response elements for imaging the brain. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 6(5), p.647-660.

Wu J.C. et al., 2001. Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 4(4), p.297-306.

Yamashita Y., Maki, A & Koizumi, H., 2001. Wavelength dependence of the precision of noninvasive optical measurement of oxy-, deoxy-, and total-hemoglobin concentration. *Medical physics*, 28(6), p.1108-1114.

Yaroslavsky A.N. et al., 2002. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. *Physics in medicine and biology*, 47(12), p.2059-2073.

Yoriyaz H. et al., 2000. Absorbed fractions in a voxel-based phantom calculated with the MCNP-4B code. *Medical physics*, 27(7), p.1555-1562.

Yu A.S. et al., 2009. Quantification of cerebral glucose metabolic rate in mice using 18F-FDG and small-animal PET. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 50(6), p.966-973.

Zhang W. et al., 1999. Bioluminescence for biological sensing in living mammals. *Advances in experimental medicine and biology*, 471, p.775-784.

Zimmer L et al., 2002. The potential of the beta-Microprobe, an intracerebral radiosensitive probe, to monitor the [(18)F]MPPF binding in the rat dorsal raphe nucleus. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 29(9), p.1237-1247.

Zimmer L et al., 2003. Carbon-11 labelling of 8[[3-[4-(2-[(11)C]methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-2-hydroxypropyl]oxy]thiochroman, a presynaptic 5-HT(1A) receptor agonist, and its in vivo evaluation in anaesthetised rat and in awake cat. *Nuclear medicine and biology*, 30(5), p.541-546.

Zimmer L. et al., 2002. Effect of endogenous serotonin on the binding of the 5-HT1A PET ligand 18F-MPPF in the rat hippocampus: kinetic beta measurements combined with microdialysis. *Journal of neurochemistry*, 80(2), p.278-286.

Zimmer L., et al., 2002. SIC, an intracerebral beta(+)-range-sensitive probe for radiopharmacology investigations in small laboratory animals: binding studies with (11)C-raclopride. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 43(2), p.227-233.

