



Analyse du couplage neurovasculaire et de la connectivité fonctionnelle corticale chez la souris par imagerie optique

Mémoire

Jordan Charest

Maîtrise en physique - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

Analyse du couplage neurovasculaire et de la connectivité fonctionnelle corticale chez la souris par imagerie optique

Mémoire

Jordan Charest

Sous la direction de:

Michèle Desjardins, directrice de recherche
Patrick Desrosiers, codirecteur de recherche

Résumé

L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) BOLD repose généralement sur l'hypothèse d'un couplage linéaire et constant entre l'activité neuronale et la réponse vasculaire. Or, de nombreux travaux ont montré que cette relation, appelée couplage neurovasculaire, est complexe, variable et dépendante de multiples facteurs physiologiques et fonctionnels. Comprendre les interactions entre les systèmes neuronal et vasculaire tout en étant en mesure de les analyser séparément constitue ainsi un enjeu central en neurosciences et en imagerie cérébrale. Ce mémoire vise donc à caractériser le couplage neurovasculaire et l'organisation fonctionnelle du système neuronal et du système vasculaire du cortex de la souris à l'aide de méthodes d'imagerie optique permettant d'accéder directement et séparément à ces deux systèmes.

Dans un premier temps, nous quantifions le couplage neurovasculaire dans six régions corticales (motrice primaire et secondaire, somatosensorielle primaire, associative pariétale, visuelle et rétrospéniale) et analysons sa dépendance sur l'âge de l'animal ainsi que son état fonctionnel. Les résultats montrent que le couplage varie significativement entre régions et qu'il est affecté par l'état de vigilance et par les co-fluctuations neuronales, sans différence significative entre souris jeunes et âgées.

Dans un second temps, nous analysons la connectivité fonctionnelle des systèmes neuronal et vasculaire séparément, et nos résultats mettent en évidence une organisation communautaire propre à chacun des deux réseaux. La connectivité intra-régionale et inter-régionale montre des différences marquées selon la région corticale, avec des résultats plus homogènes dans le système vasculaire. Les co-fluctuations neuronales et l'état de vigilance sont associés à la connectivité des deux systèmes, mais seul le système vasculaire voit sa connectivité significativement affectée par l'âge.

Ce travail met en évidence la complexité du système neurovasculaire et souligne l'importance d'approches multimodales pour en caractériser les interactions et l'organisation. Il propose un cadre méthodologique applicable à l'étude quantitative de ce système qui puisse aussi être étendu à l'étude de données comportant des facteurs comportementaux et neuromodulateurs.

Abstract

BOLD functional magnetic resonance imaging (fMRI) generally rests on the assumption of a linear and constant coupling between neuronal activity and the vascular response. However, multiple works have shown that this relationship, called the neurovascular coupling, is complex, variable, and dependent on multiple physiological and functional factors. Understanding the interactions between the neuronal and vascular systems while being able to analyze them separately thus constitutes a major challenge in neuroscience and brain imaging. This master's thesis aims to characterize the neurovascular coupling and functional organization of the mouse cortex by using optical imaging methods that allow for separate and direct access to both systems.

First, we quantify the neurovascular coupling in six cortical regions (primary and secondary motor, primary somatosensory, parietal associative, visual, retrosplenial) and analyze its dependence on the animal's age and functional state. Our results show that the coupling significantly varies between regions and that it is affected by the animal's arousal state and neuronal co-fluctuations, without significant differences between young and old individuals.

Second, we analyze the functional connectivity of both the neuronal and vascular systems separately, and our results reveal a community-based organization that is specific to each network. The within-region and between-regions connectivity shows strong differences between cortical regions, with more homogeneous results in the vascular system. Neuronal co-fluctuations and arousal state are associated with connectivity in both systems, although the connectivity is significantly altered with age only in the vascular system.

This work shines light on the complexity of the neurovascular system and underlines the importance of multimodal approaches to characterize its interactions and organization. It also proposes a methodology for the study of this system that can be extended to data that includes variables related to behavior and neuromodulation.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Remerciements	x
Avant-propos	xi
Introduction	1
1 Imagerie et méthodes	6
1.1 La souris comme modèle animal	7
1.2 Acquisition des signaux	10
1.3 Bruit et artefacts	15
1.4 Pré-traitement des données	17
1.5 Co-enregistrement cortical	19
2 Analyse	24
2.1 Couplage neurovasculaire	25
2.2 Connectivité fonctionnelle	29
2.3 Segmentation des données	36
2.4 Validité de la méthode de segmentation	38
3 Résultats et discussion	44
3.1 Tests statistiques	45
3.2 Couplage neurovasculaire	47
3.3 Connectivité fonctionnelle	52
3.4 Facteurs limitants et avenues futures	62
Conclusion	64
Bibliographie	67

A	Méthode de traitement des artéfacts de mouvement	80
A.1	Obstacles à la correction du mouvement	80
A.2	Méthode de correction du mouvement	81
B	Processus de traitement de données	83
C	Interface graphique	86
C.1	Aperçu d'ensemble	86
C.2	<i>HDF5 Processing</i>	88
C.3	Traitement de données en lot	88
D	Souris imagées	90

Liste des tableaux

D.1	Souris utilisées dans le cadre de ce projet	90
-----	---	----

Liste des figures

1.1	Schéma de la fenêtre crânienne et des régions corticales.	9
1.2	Coefficient d'extinction molaire de l'hémoglobine	11
1.3	Exemple de densité spectrale de puissance des signaux neuronal et vasculaire	13
1.4	Exemple d'utilisation du logiciel <i>facemap</i>	14
1.5	Exemple de série temporelle de diamètre de la pupille	15
1.6	Aperçu des masques appliqués sur la fenêtre corticale	19
1.7	Comparaison de signaux de plusieurs régions dans les deux hémisphères	21
1.8	Principales régions et sous-régions visibles par la fenêtre corticale	23
1.9	Emplacement des principales régions par rapport à une fenêtre corticale	23
2.1	Fonction de réponse hémodynamique typique	26
2.2	Exemple du décalage τ entre le signal neuronal et le signal vasculaire	27
2.3	Couplage neurovasculaire et décalage entre les signaux neuronal et vasculaire	28
2.4	Connectivité fonctionnelle obtenue à partir de signaux corticaux	30
2.5	Exemple de matrice de connectivité fonctionnelle et de matrice de connectivité moyenne	32
2.6	Exemple de matrice de connectivité interne et externe	33
2.7	Exemple de série temporelle de co-fluctuation neuronale et de matrice de connectivité fonctionnelle dynamique	37
2.8	Exemple de série temporelle de diamètre de pupille segmentée selon son amplitude	38
2.9	Exemples de fonctions qui ont une corrélation plus basse à haute amplitude	40
2.10	Séries de co-fluctuations (CTS) neuronale et vasculaire pour la souris M396	41
3.1	Comparaison du couplage neurovasculaire moyen des souris transgéniques et wildtype	48
3.2	Couplage neurovasculaire moyen par région	49
3.3	Couplage neurovasculaire pour les segments de basse et haute amplitude	50
3.4	Variation du couplage neurovasculaire entre deux segments	51
3.5	Exemple de connectivité fonctionnelle et de connectivité fonctionnelle moyenne	53
3.6	Connectivité moyenne de chaque région corticale	54
3.7	Comparaison de la connectivité moyenne globale des souris transgéniques et wildtype	56
3.8	Résultats de connectivité interne et externe pour toutes les régions, neuronal et vasculaire	58
3.9	Différence entre la connectivité interne et la connectivité externe pour chaque région	59
3.10	Connectivité interne et externe selon le groupe d'âge de la souris	60

3.11	Connectivité moyenne (sur toutes les régions) selon les co-fluctuations neuronales et le diamètre de la pupille	61
A.1	Signaux neuronal, vasculaire et de mouvement de la souris	81

I always say that it's about
breaking the rules. But the secret
of breaking rules in a way that
works is understanding what the
rules are in the first place.

Rick Wakeman

Remerciements

Un merci particulier à Michèle et à Patrick pour tout leur support, leur écoute, leur disponibilité et leur expertise au courant de ce projet. Ce fut un plaisir de travailler avec vous tout au long de ma maîtrise et vos expertises complémentaires ont été des atouts incomparables. C'est en grande partie grâce à vous si j'en ai appris autant sur moi-même que sur les souris au fil de ma maîtrise.

Un grand merci à mes amis et collègues qui ont rendu les journées au bureau (et à l'extérieur du bureau) plus plaisantes et divertissantes. Le chemin aurait été beaucoup plus monotone sans vous.

Un merci au café Fou Aéliés et à son personnel. Rares sont les heures qui furent aussi productives que celles passées là-bas avec un espresso-tonique en main.

Un merci à mon chat pour son accompagnement affectueux et pour ses demandes constantes d'attention qui me forcent à regarder autre chose que mon écran, même s'il traite mon clavier comme sa piste de course personnelle. Si vous trouvez des erreurs de frappe, c'est sa faute !

Un merci à mes grands-parents qui n'ont jamais douté une seule seconde que je ferais des études graduées un jour. C'est un privilège de pouvoir se lever chaque matin pour aller apprendre et réfléchir sans devoir être anxieux pour les fins de mois, et c'est à eux que je dois cette paix d'esprit.

Un grand merci à ma famille pour leur support inconditionnel, pour les mots d'encouragement quand c'est plus difficile, pour leur énergie quand c'est plus facile, pour les discussions honnêtes quand on en a besoin et pour les soupers surprise quand j'ai oublié de faire l'épicerie.

Finalement, le plus grand des mercis à Rachel, ma complice et ma meilleure moitié. Ta présence constante, ta compréhension et notre quotidien partagé font la différence à tous les jours. Merci de décider à chaque matin de faire équipe avec moi à travers les plus et les moins beaux jours.

Avant-propos

Déclaration générale de l'utilisation d'outils d'intelligence artificielle générative

Avec l'accord de ma directrice et de mon codirecteur de recherche, des outils d'IA générative ont été utilisés à diverses étapes du processus de recherche et les contenus qu'ils ont générés ont été systématiquement contre-vérifiés. Ils ont servi à trois aspects, soit la réalisation de l'interface graphique (annexe C), la visualisation des données, et la suggestion de fonctions d'analyse.

Réalisation de l'interface graphique : des outils d'IA ont été utilisés afin de produire du code Python pour mettre sur pied une interface graphique utilisant la librairie *tkinter*. L'IA a été utilisée majoritairement en ce qui a trait à l'interface plutôt que pour les fonctions d'analyse et de traitement de données que l'interface permet d'utiliser. Le code suggéré a été rigoureusement testé et contre-vérifié. La contribution d'outils d'IA générative sur ce point est spécifiquement mentionnée dans l'annexe C.

Visualisation des données : des outils d'IA ont été utilisés afin de produire du code Python dans le but de générer des graphiques et figures et de visualiser les données obtenues avec la librairie *matplotlib*. Les scripts ainsi produits ont l'unique fonction de réaliser des figures et graphiques et ne modifient pas directement les données. La contribution d'outils d'IA générative sur ce point est spécifiquement mentionnée dans les chapitres 2 et 3.

Suggestion de fonctions d'analyse : dans quelques cas, des outils d'IA ont été utilisés afin d'obtenir des suggestions de fonctions Python appropriées pour l'analyse de données, par exemple lors du pré-traitement des données brutes, lors d'analyses complémentaires, pour l'optimisation de code existant ou encore pour déterminer les tests statistiques appropriés. Les fonctions suggérées par l'IA ont été testées manuellement avant l'utilisation sur les données, et le code d'analyse intégrant ces fonctions a aussi été écrit manuellement. La contribution d'outils d'IA générative sur ce point est spécifiquement mentionnée dans les chapitres 2 et 3.

Dans tous les cas, le code proposé par les outils d'IA a été testé manuellement sur des données simplifiées avant d'être utilisé dans l'analyse, afin de s'assurer de la véracité et la robustesse des résultats.

Aucun outil d'intelligence artificielle générative n'a été utilisé pour produire du texte ou en faire l'analyse, la reformulation ou la traduction (hormis quelques termes scientifiques). Aucun outil d'intelligence artificielle n'a été utilisé afin d'analyser les résultats obtenus ou de contribuer à la discussion des résultats.

L'outil d'IA LanguageTool a été utilisé afin d'effectuer la correction orthographique et grammaticale du texte. Certaines références BibTeX ont été formatées avec l'aide de l'IA.

L'outil d'intelligence artificielle Elicit a été utilisé pour certaines parties de la revue de littérature. Tous les articles suggérés par cet outil ont été consultés manuellement avant d'être cités dans ce mémoire.

Introduction

L'IRM et ses limites

L'imagerie par résonance magnétique est vastement utilisée pour imager le cerveau humain en raison de nombreux avantages. La variété de types d'IRM existants permet d'obtenir une multitude de mesures de la zone imagée : l'IRM structurelle (sMRI) permet d'imager précisément les volumes et les structures des tissus, l'IRM de diffusion (DWI) permet de détecter la diffusion de l'eau et ainsi d'effectuer des analyses des fibres de matière blanche, et l'IRM fonctionnelle (fMRI) permet quant à elle d'analyser la dynamique de la fonction cérébrale au fil d'une séance d'imagerie. Les statistiques canadiennes révèlent une augmentation considérable de l'utilisation de l'IRM dans les dernières décennies [3, 22].

Et pour bonne cause : l'un des avantages notables de l'IRM par rapport à des méthodes d'imagerie optique est qu'elle peut être faite de manière totalement non invasive, sans contact avec le sujet hormis avec la machine. Comparativement à d'autres techniques comme la tomographie par émission de positrons (TEP), qui requiert l'injection d'un traceur, ou l'électroencéphalographie, qui offre une résolution limitée via des électrodes, cet avantage fait de l'IRM une technique de choix pour l'imagerie médicale et la recherche clinique.

L'IRM fonctionnelle BOLD (*blood oxygenation level dependent*), utilisée pour l'imagerie fonctionnelle du cerveau, se base sur un principe de réponse vasculaire : un groupe de neurones qui s'active a besoin d'un apport en oxygène, comme n'importe quel groupe de cellules activé. À la suite de son activation, le sang doit affluer vers la région activée pour fournir les neurones en oxygène. Une technique qui serait en mesure de détecter la variation du volume sanguin dans le cerveau permettrait donc de mesurer de manière indirecte l'activité neuronale.

Sachant que l'hémoglobine oxygénée et l'hémoglobine désoxygénée ont des propriétés magnétiques différentes qui peuvent être décelées lorsqu'elles sont plongées dans un champ magnétique, la machine d'IRM mesure la variation spatiale et temporelle de sang oxygéné dans le cerveau. De la mesure du système vasculaire, on obtient une mesure de l'activité neuronale en faisant le raisonnement inverse : en posant comme hypothèse une réponse typique des vaisseaux sanguins à la suite d'une activation neuronale, souvent appelée réponse hémodynamique. Cette relation entre le système vasculaire et le système neuronal est fondamentale au principe

même de l'imagerie par résonance magnétique BOLD.

Ce principe, bien que fort utile pour obtenir des mesures non invasives, représente toutefois une barrière à l'étude des systèmes neuronal et vasculaire de manière séparée ; il est impossible avec l'IRMf de départager totalement les effets strictement neuronaux des effets vasculaires, puisque l'activité neuronale ne peut être obtenue qu'au travers d'un filtre vasculaire. L'interprétation du signal BOLD et de l'activité neuronale qu'il mesure s'en trouve complexifiée.

Si la relation entre les deux systèmes était une simple relation de proportionnalité, le problème serait bien moindre. Or, la relation entre le système vasculaire et le système neuronal (souvent nommée couplage neurovasculaire, ou unité neurovasculaire lorsqu'on considère tous ses constituants [64]) est complexe, variable, et repose sur de nombreux phénomènes et paramètres :

- **Bidirectionnel** : non seulement l'activité neuronale dirige en grande partie l'activité vasculaire, mais l'activité du système vasculaire peut elle aussi influencer l'activité neuronale [67]
- **Non local** : le couplage neurovasculaire en un point donné est affecté par l'activité des volumes environnants [40] et a des effets sur l'activité neurovasculaire à proximité [6].
- **Dépendant de facteurs externes** : l'état de vigilance (ou état d'éveil) affecte le système vasculaire différemment du système neuronal [89]. Certains changements de volume sanguin sont indépendants de l'activité neuronale [110].
- **Variable spatialement** : le couplage neurovasculaire dépend de la région et de la profondeur corticale étudiée. [64, 96, 111, 124]

En plus de ces paramètres qui influencent directement le couplage, il est connu que le système vasculaire et le système neuronal sont tous deux affectés par des facteurs physiologiques comme le vieillissement. [14, 33, 37, 72, 74, 76, 78, 81, 82, 93, 130]. La compréhension de ces systèmes et de leur développement est d'autant plus nécessaire étant donné le vieillissement accéléré de la population canadienne comparativement au reste du monde [23, 123]. Plusieurs études ont montré que le développement de plusieurs maladies neurodégénératives est lié au système neurovasculaire [4, 63, 118], mais de nombreux aspects de ce dernier sont encore mal compris [106].

Séparer le neurone du vaisseau sanguin

Ces nombreux facteurs suggèrent que la relation entre l'activité neuronale et l'activité vasculaire n'est potentiellement pas aussi simple et invariable qu'on pourrait le croire, et la nécessité d'analyser ces deux systèmes de manière séparée devient apparente. Une telle approche permettrait de mieux comprendre les différences et les particularités de ces systèmes qui ont des structures et des fonctions totalement différentes, mais permettrait aussi de comprendre comment ils interagissent ensemble pour former le système cérébral.

Ainsi, l'imagerie optique se présente comme une technique permettant d'imager directement le cerveau et de résoudre individuellement chacun des systèmes qui le constituent. Elle est difficilement applicable chez les humains cependant, car pour effectuer de l'imagerie optique *in vivo* un accès direct à l'intérieur du crâne est nécessaire. Nous devons donc nous tourner vers d'autres modèles animaux qui puissent permettre ce genre de manipulations invasives. Les modèles ne possédant pas de système vasculaire semblable au nôtre, c'est-à-dire les non-mammifères comme le poisson-zèbre ou le *C. elegans* par exemple, sont à écarter d'emblée. D'autres modèles, comme les primates non-humains, comportent une complexité élevée en termes de coûts et de logistique.

La souris, dont l'utilisation est répandue en neurosciences [41], est alors un modèle animal approprié pour l'étude de ces systèmes. Non seulement il s'agit d'un mammifère ayant un système neuronal et un système vasculaire qui peuvent être comparés à ceux d'un humain, mais il est possible d'effectuer l'étude sur des cohortes de nombreux individus. L'avantage le plus notable est cependant la possibilité d'effectuer l'imagerie optique corticale : en retirant une partie du crâne et en posant une fenêtre crânienne transparente, il est possible d'avoir un accès optique direct au cortex, la couche supérieure du cerveau, et ainsi d'imager directement et séparément le système neuronal et le système vasculaire. De plus, l'accès à des lignées de souris transgéniques exprimant dans leurs neurones des fluorophores, notamment le marqueur calcique GCaMP [30], facilite grandement le processus d'imagerie neuronale.

L'espérance de vie d'une souris, d'environ deux ans en moyenne, est aussi un facteur important car il permet d'avoir accès à des mesures sur la durée de vie totale de l'individu, ce qui représente un défi de taille avec l'humain ou d'autres espèces de plus grande longévité. Étant donné que le vieillissement est un facteur important en ce qui concerne le développement des systèmes neuronal et vasculaire, il est particulièrement intéressant d'analyser comment ces systèmes et leur couplage évoluent au cours du vieillissement.

Des systèmes en interaction

Ayant ainsi accès à ces deux systèmes distincts, il peut être utile de conceptualiser ceux-ci comme des réseaux, soit des systèmes constitués d'une multitude de composantes en interaction les unes avec les autres. Si toutes les composantes de ces réseaux (qu'il s'agisse de neurones, de groupes de neurones ou de régions corticales) possèdent leur activité propre, elles sont tout de même influencées par l'activité des composantes qui leur sont connectées, directement ou indirectement. On peut par exemple penser, à petite échelle, à un neurone excitateur dont l'activité influence celle des neurones postsynaptiques, ou encore à la région sensorielle dont l'activité pourrait entraîner celle de la région motrice, à plus grande échelle. On pourrait même modéliser le système cortical comme comportant deux réseaux, l'un neuronal et l'autre vasculaire, qui sont connectés entre eux. Cette conception en réseau permet d'analyser la connectivité, la façon dont les composantes (aussi dites *nœuds*) sont organisées et connectées

entre elles.

Notre premier objectif sera d'utiliser des données optiques provenant du système neuronal et du système vasculaire de souris afin de quantifier l'interaction entre ces deux systèmes. Pour ce faire, nous emploierons la notion de couplage neurovasculaire, un concept fréquemment étudié en neurosciences afin de prédire le comportement attendu du système vasculaire suivant un pic d'activité neuronal. Une fois que nous disposerons d'une définition du couplage neurovasculaire adaptée à nos données, nous le calculerons pour chaque souris afin d'analyser sa dépendance sur divers facteurs tels que la région corticale, l'âge de la souris ou encore son état de vigilance ou d'activité neuronale. Ceci nous permettra de déterminer à quel point la réponse hémodynamique est constante spatialement et temporellement.

Notre deuxième objectif sera d'utiliser ces mêmes mesures optiques des systèmes neuronal et vasculaire afin d'analyser la connectivité de chacun de ces systèmes, c'est-à-dire la manière dont les différentes régions s'organisent et se connectent entre elles au niveau de leurs fonctions. Cette analyse sera faite à partir de la connectivité fonctionnelle, une mesure qui quantifie à quel point l'activité de chaque nœud d'un réseau est corrélée avec celle des autres nœuds. Cette notion de connectivité fonctionnelle sera étendue aux concepts de connectivité interne et externe, qui permettent de quantifier à quel point une région est fortement connectée au sein d'elle-même comparativement à sa connectivité avec les autres régions, ainsi qu'au concept de connectivité fonctionnelle dynamique, qui permet de segmenter l'état de la souris selon les variations du système neuronal au fil du temps. Tout comme dans le cas du couplage neurovasculaire, nous examinerons aussi comment la connectivité des systèmes neuronal et vasculaire dépend de la région corticale, de l'âge et de l'état de vigilance de la souris.

D'abord, le **Chapitre 1 - Imagerie et méthodes** aborde les méthodes que nous utilisons afin d'obtenir des données corticales chez les souris. L'utilisation du modèle animal de la souris y est justifiée et détaillée. Le système d'imagerie optique nous permettant d'obtenir les signaux neuronaux et vasculaires y est expliqué, ainsi que les imperfections des signaux recueillis et le traitement qui doit être fait sur ceux-ci. Finalement, la technique de co-enregistrement cortical, qui permet d'associer les signaux corticaux à des régions fonctionnelles connues du cortex de la souris, est détaillée.

Le **Chapitre 2 - Analyse** contient des détails sur les analyses qui sont effectuées à partir des données mesurées et traitées. La notion de couplage neurovasculaire, qui nous permettra d'adresser notre premier objectif, y est revisitée afin d'en obtenir une définition claire et robuste qui puisse être appliquée à l'analyse de l'interaction entre les deux systèmes. La connectivité fonctionnelle, qui elle servira dans le cadre de notre deuxième objectif afin de quantifier la relation entre différentes régions corticales, est ensuite détaillée. Plusieurs extensions sont faites à la notion de connectivité fonctionnelle afin d'obtenir d'autres méthodes d'analyse : la connectivité moyenne, la connectivité interne et externe, ainsi que la connectivité fonctionnelle

dynamique. De brèves discussions de l'état des connaissances en ce qui concerne le couplage neurovasculaire et la connectivité corticale sont aussi faites dans le but de diriger nos analyses et d'interpréter les résultats.

Les résultats obtenus avec les méthodes d'analyse sont exposés au **Chapitre 3 - Résultats et discussion**. Dans un premier temps, les tests statistiques nécessaires à l'interprétation rigoureuse des données sont discutés. Dans un second temps, les résultats obtenus pour le couplage neurovasculaire sont détaillés, et révèlent des dépendances sur plusieurs paramètres dont la région corticale étudiée, l'état de vigilance et l'état de co-fluctuations neuronales de la souris, mais pas sur l'âge du sujet. Finalement, la connectivité fonctionnelle des systèmes neuronal et vasculaire est discutée. Elle révèle des dépendances sur la région corticale, l'état de l'animal, et dans le cas du système vasculaire son âge. Les résultats mettent aussi en lumière la structure communautaire des réseaux corticaux ainsi que certaines différences qui existent entre eux.

Une brève conclusion résume les principaux résultats obtenus, les facteurs limitants de nos travaux, ainsi que des avenues futures qui pourraient être explorées afin de pousser plus loin les analyses faites ici.

Chapitre 1

Imagerie et méthodes

Afin d'effectuer les analyses de couplage et de connectivité, les données vasculaires et neuronales doivent d'abord être mesurées chez la souris, puis subir un traitement préliminaire.

Ce chapitre expose d'abord les méthodes d'acquisition des données : le modèle animal employé, le système d'imagerie ainsi que les mesures que ce dernier permet d'obtenir. Trois types de signaux sont obtenus à partir du système d'imagerie :

- Un **signal vasculaire**, obtenu par imagerie optique intrinsèque (IOI) en réflectance. Cette technique mesure la proportion de la lumière incidente sur le cortex qui est réémise afin de déterminer la quantité d'hémoglobine se trouvant dans le volume d'imagerie.
- Un **signal neuronal**, obtenu par imagerie optique en fluorescence. Après avoir excité optiquement un marqueur dans les neurones de la souris, celui-ci émet de la fluorescence qui dépend de l'activité calcique du neurone et permet de mesurer l'activité neuronale.
- Un **signal de pupillométrie**, soit le diamètre de la pupille de la souris. Celui-ci est obtenu à partir d'une vidéo de surveillance de la souris obtenue en même temps que l'imagerie corticale. Il permet d'obtenir une mesure indirecte de l'état de vigilance de la souris, qui représente son éveil et son agitation.

Ensuite, une explication du traitement subi par les données est fournie, notamment les processus de sélection de la région d'intérêt et de filtrage. Ceci permet d'obtenir une fenêtre corticale qui n'est pas obstruée par des vaisseaux sanguins, des imperfections dans la fenêtre, ou des zones d'ombres qui peuvent altérer les données.

Finalement, la méthode de co-enregistrement, c'est-à-dire l'association de chaque pixel visible dans la fenêtre crânienne avec une région corticale connue, est détaillée. Ainsi, il est possible de ramener la fenêtre corticale, qui contient généralement plus de 40,000 pixels, en seulement six régions fonctionnelles corticales, ce qui facilite l'analyse des données et permet la comparaison des régions et des différentes souris entre elles.

Les données utilisées dans le cadre de ce projet totalisent 48 jeux de données issus de l'imagerie

en état de repos (*resting state*) de 21 souris âgées entre 6 et 16 mois (par intervalles de deux mois). Les données proviennent d’un projet de recherche mené par Alexandre Cléroux Cuillerier sous la supervision de Michèle Desjardins. Au cours de ce projet, plusieurs cohortes de souris sont suivies entre 6 et 20 mois et plusieurs tests et mesures sont menées, y compris l’imagerie à l’état de repos qui est utilisée ici. Au moment d’effectuer ce projet, des données chez des souris de 6 jusqu’à 16 mois sont disponibles. Il est à noter que la mise en place du système d’imagerie et l’acquisition des données ont été faites entièrement par Alexandre Cléroux Cuillerier ; la contribution originale de ce projet de maîtrise correspond au traitement et à l’analyse de ces données.

L’imagerie à l’état de repos (*resting state*) est utilisée, c’est-à-dire que les souris sont imagées pendant une période de huit minutes (cinq pour certaines souris *wildtype*, qui proviennent d’un protocole de recherche précédent) alors qu’elles sont éveillées, mais pas soumises à des stimuli ou à une tâche spécifique. En imagerie à l’état de repos, on peut typiquement s’attendre à voir apparaître des patrons d’activité spontanée [13, 32, 80], qui peuvent être associés ou pas à des patrons d’activité reliés à des fonctions spécifiques, comme il serait le cas par exemple avec des stimuli visuels ou sensoriels [10, 13, 24].

Les souris utilisées dans le cadre de ce projet se séparent en deux types : des souris transgéniques, qui expriment le marqueur calcique fluorescent GCaMP6s nécessaire pour l’imagerie neuronale, et des souris dites *wildtype* qui ne l’expriment pas. Davantage de détails sur le marqueur calcique et les souris *wildtype* sont donnés aux sections 1.1.2 et 1.2.2. Les données utilisées ici proviennent de souris réparties de la manière suivante :

- **Souris transgéniques (GCaMP) : 13**
 - 5 mâles (5x 6 mois, 4x 8 mois, 5x 10 mois, 4x 12 mois, 3x 14 mois)
 - 8 femelles (6x 6 mois, 3x 8 mois, 2x 10 mois, 2x 12 mois, 1x 14 mois, 1x 16 mois)
- **Souris *wildtype* : 8**
 - 4 mâles (1x 6 mois, 3x 12 mois)
 - 4 femelles (1x 6 mois, 1x 8 mois, 1x 10 mois, 3x 12 mois, 1x 14 mois, 1x 16 mois)

Pour un total de 36 jeux de données chez des souris transgéniques, et 12 jeux de données chez des souris *wildtype*. Le tableau D.1 se trouvant à l’annexe D contient davantage d’informations sur les souris qui ont été imagées et dont les données ont été utilisées dans le cadre de ce projet.

1.1 La souris comme modèle animal

1.1.1 Pourquoi la souris ?

Le modèle animal utilisé pour ce projet doit avoir deux particularités spécifiques :

- Un système vasculaire et un système neuronal superposés, c’est-à-dire qu’ils doivent opérer dans les mêmes zones pour en faire l’imagerie simultanée. Posséder un système vasculaire semblable à celui de l’humain est aussi un atout pour pouvoir interpréter les résultats obtenus dans un contexte de santé.
- Il doit être possible d’effectuer de l’imagerie optique invasive afin d’obtenir de manière directe et distincte les signaux vasculaires et neuronaux.

Le premier critère écarte d’emblée certains modèles animaux comme le *c. elegans*, qui malgré leur simplicité d’imagerie ne sont pas des mammifères et n’ont donc pas de système circulatoire sanguin semblable à l’humain [11, 109]. Le second critère, lui, écarte principalement l’humain comme modèle étant donné l’impossibilité de réaliser l’imagerie optique invasive *in vivo*.

La souris est un modèle animal largement utilisé en neurosciences [41] pour l’étude des systèmes corticaux. Comparativement aux humains et aux primates non humains, son système cérébral présente plusieurs différences majeures, par exemple au niveau du ratio d’artérioles et de vénules pénétrantes [107], de la géométrie vasculaire [17], des régions corticales fonctionnelles qu’on y retrouve [75] ou de la densité des connexions neuronales [58]. Cependant, il existe aussi plusieurs ressemblances notables : le cerveau de la souris présente une variation similaire de la densité vasculaire en fonction de la profondeur [17], montre une structure hiérarchique semblable et des propriétés similaires dans certaines régions comme le cortex visuel [75], plusieurs circuits corticaux communs avec l’humain [9] ainsi qu’une proportion semblable de connexions inhibitrices et excitatrices des neurones pyramidaux [75].

En somme, sans être aussi près du cerveau humain que celui d’un primate non humain [9], le système cortical de la souris possède plusieurs ressemblances qui rendent tout de même son étude pertinente dans un contexte de neurosciences [69]. Les besoins logistiques relativement moindres des souris (coût, logement, nourriture, lignées transgéniques, etc.) rendent aussi possible des études longitudinales sur un nombre considérable d’individus. L’espérance de vie moyenne d’une souris de laboratoire étant d’environ 1,8 à 2 ans [116], il est aussi possible de réaliser des analyses tout au long de la vie de la souris, ce qui est évidemment très difficile à réaliser chez l’humain.

L’un des avantages les plus notables que la souris possède par rapport à l’humain est la possibilité d’obtenir directement les mesures des signaux neuronaux et vasculaires simultanément par imagerie optique. En retirant une portion du crâne de la souris en y apposant une fenêtre crânienne transparente, il est possible d’obtenir une vue du cortex, soit la couche supérieure du cerveau. Davantage de détails concernant les fenêtres crâniennes et les régions qui s’y trouvent sont donnés à la section 1.1.3.

1.1.2 Souris transgéniques et marqueur calcique

Les souris utilisées dans le cadre de ce projet sont issues d'une lignée transgénique CaMKII-tTa/TRE-GCaMP6s. Le fluorophore GCaMP6s qu'on retrouve dans les neurones de ces souris est un marqueur calcique [30] ; lorsqu'il est excité par une lumière bleue à 488 nm, il émet de la fluorescence dans le vert autour de 512 nm [129] en fonction de l'activité calcique du neurone. On peut donc obtenir un signal correspondant à l'activité neuronale corticale à travers l'activité calcique.

Afin d'agir comme groupe contrôle, des souris dites *wildtype* sont aussi utilisées. Celles-ci n'expriment pas le marqueur GCaMP6s mais sont autrement semblables aux souris transgéniques. En théorie, le signal neuronal observé dans le cortex des souris *wildtype* devrait correspondre à du bruit étant donné l'absence de fluorescence. Ce n'est pas le cas pour l'imagerie vasculaire, qui fonctionne de manière identique chez les souris transgéniques et non transgéniques, car elle repose sur des propriétés physiologiques intrinsèques au sang plutôt que sur un marqueur qui doit être excité (voir section 1.2).

Le signal neuronal obtenu à partir de la fluorescence du marqueur GCaMP6s est détaillé à la section 1.2.2.

1.1.3 Fenêtre corticale

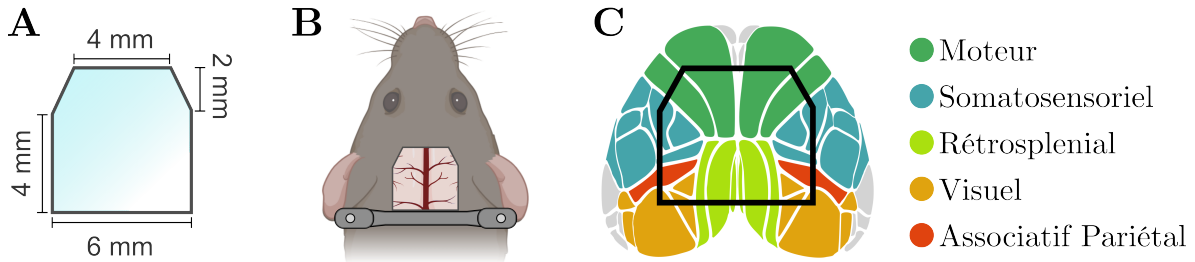


FIGURE 1.1 – Schéma de la fenêtre crânienne et des régions corticales. **A** : dimensions de la fenêtre. **B** : placement et échelle approximative de la fenêtre sur la souris. **C** : placement et échelle approximative de la fenêtre par rapport aux régions anatomiques majeures. Régions tirées du *Allen Mouse Brain Common Coordinate Framework* [125]. Figure adaptée d'Alexandre Cléroutx Cuillerier.

Afin d'avoir une vue du cortex, une fenêtre corticale transparente est posée sur le crâne de la souris lors d'une chirurgie. Un schéma de la fenêtre corticale se trouve à la figure 1.1. Elle permet d'observer cinq régions majeures : motrice, somatosensorielle, rétrospléniale, visuelle et associative (dépendant du niveau de subdivision considéré). Une explication des régions considérées pour la présente analyse se trouve à la section 1.5.1.

Grâce à une barre crânienne (*headpost*) se trouvant sous la fenêtre et elle aussi collée au crâne (figure 1.1 B), lors de la séance d'imagerie la souris peut être fixée sous la caméra de façon

à ce que la fenêtre corticale soit relativement immobile sous l’objectif. Certains mouvements peuvent parfois survenir, tel que décrit à la section 1.3.

1.2 Acquisition des signaux

Trois diodes électroluminescentes (DEL) éclairent séquentiellement le cortex : une bleue à 488 nm, une verte à 530 nm, et une rouge à 630 nm [79]. Une caméra est positionnée directement au-dessus de la fenêtre corticale et mesure le signal réfléchi et émis par le cortex lors de l’illumination dans ces trois canaux. L’activité vasculaire est ainsi mesurée à partir des canaux rouge et vert en imagerie par réflectance, tandis que le signal neuronal est mesuré par fluorescence à partir de l’illumination du canal bleu. L’imagerie vasculaire et neuronale sont décrites aux sections 1.2.1 et 1.2.2 respectivement. La majorité du montage expérimental et de la méthode d’acquisition des données neuronales et vasculaires est tirée directement de la méthode détaillée dans [79].

Simultanément à la séance d’imagerie optique, une vidéo de surveillance (*monitoring*) de la tête de la souris est obtenu. Celle-ci permet d’extraire le diamètre de la pupille (pupillométrie) de la souris au cours de la séance d’imagerie, tel que décrit à la section 1.2.3.

1.2.1 Signal vasculaire

L’activité vasculaire, parfois appelée activité hémodynamique, est obtenue par imagerie optique intrinsèque (IOI) en réflectance. Le cortex est illuminé par les DEL rouge et verte, et la caméra mesure la proportion de la lumière incidente qui est réfléchi par le cortex. On mesure donc ainsi la proportion de lumière qui a été absorbée lors de la diffusion de la lumière dans les tissus. Puisque l’hémoglobine désoxygénée (HbR pour *reduced*) et l’hémoglobine oxygénée (HbO) ont des absorbances différentes (voir la figure 1.2), cette mesure contient de l’information sur la proportion de l’un et de l’autre dans les tissus du cortex.

À partir de ces mesures de réflectance, on cherche à connaître la variation de la quantité d’hémoglobine au fil du temps. En effet, on s’attend à ce que plusieurs effets fassent varier la quantité d’hémoglobine corticale pendant l’imagerie, notamment le changement de proportion d’hémoglobine oxygénée et désoxygénée pendant l’activité neuronale [39] ainsi que la variation du volume sanguin par vasodilatation et vasoconstriction [20, 39]. On écrira ici dHbO pour le changement de concentration d’hémoglobine oxygénée, dHbR pour l’hémoglobine désoxygénée et dHbT pour l’hémoglobine totale, tel que $dHbT = dHbO + dHbR$.

Pour passer de la mesure de réflectance mesurée par la caméra à la quantité d’hémoglobine, on doit utiliser la loi de Beer-Lambert modifiée [79]

$$I = I_0 e^{-\mu_a X + G}$$

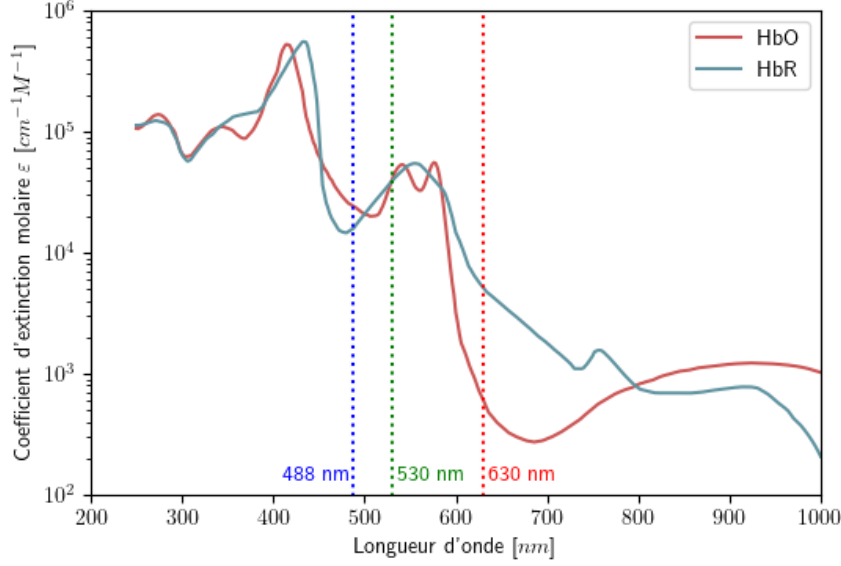


FIGURE 1.2 – Coefficient d’extinction molaire de l’hémoglobine oxygénée (HbO) et désoxygénée (HbR) en fonction de la longueur d’onde [79, 95]

avec I l’intensité mesurée, I_0 l’intensité incidente, μ_a le coefficient d’absorption, X la longueur de chemin parcouru par les photons, et G les facteurs géométriques qui affectent la proportion de la lumière réfléchie qui est captée par la caméra. Une fois I normalisé par rapport à un critère arbitraire (nous choisissons dans ce cas l’intensité moyenne $\bar{I}$), on obtient

$$\frac{I(t, \lambda)}{\bar{I}(\lambda)} = e^{-\Delta\mu_a(t, \lambda)X(\lambda)}.$$

En isolant la variation du coefficient d’absorption μ_a , on trouve

$$\Delta\mu_a(t, \lambda) = \frac{-1}{X(\lambda)} \ln \left(\frac{I(t, \lambda)}{\bar{I}(\lambda)} \right).$$

L’intensité I (et par extension l’intensité moyenne $\bar{I}$) est obtenue à partir de l’imagerie et la longueur de chemin X parcourue par les photons, qui dépend de la diffusion des tissus, peut être approximée en fonction de la longueur d’onde [79]. Le coefficient d’absorption μ_a peut ainsi être obtenu expérimentalement, ce qui fait en sorte qu’on puisse finalement employer la relation suivante :

$$\Delta\mu_a(r, t, \lambda) = \varepsilon_{\text{HbO}}(\lambda)\Delta c_{\text{HbO}}(r, t) + \varepsilon_{\text{HbR}}(\lambda)\Delta c_{\text{HbR}}(r, t).$$

Étant donné que nous connaissons ε le coefficient d’extinction molaire de l’hémoglobine (oxygénée et désoxygénée ; fig 1.2) et $\Delta\mu_a$ le coefficient d’absorption pour un pixel r donné (calculé à partir de l’intensité mesurée), on a une équation à deux inconnues. Il suffit d’effectuer la prise de mesures à deux longueurs d’ondes différentes pour obtenir un système à deux équations et

deux inconnues, ce qui permet de déterminer la variation de concentration de HbO (Δc_{HbO}) et de HbR (Δc_{HbR}) dans le volume d'imagerie en fonction du temps, et ce pour chaque pixel indépendamment. La variation de concentration totale d'hémoglobine dHbT est obtenue en additionnant les variations de concentrations dHbO et dHbR.

Certains modèles emploient la variation de volume sanguin plutôt que la variation de quantité d'hémoglobine totale [50]. En faisant l'approximation que l'hématocrite soit constant, c'est-à-dire la proportion d'hémoglobine contenue dans un volume de sang donné, alors la variation de volume sanguin est proportionnelle à la variation de la quantité d'hémoglobine. Cependant, cette hypothèse d'hématocrite constant n'est pas toujours supportée par la littérature, autant au niveau spatial [77] qu'entre les individus [132]. En conséquence, le terme « signal vasculaire » fera ici toujours référence à la variation de quantité totale d'hémoglobine plutôt qu'au changement de volume sanguin, bien que les deux soient reliés.

1.2.2 Signal neuronal

Le signal neuronal est mesuré grâce au marqueur calcique GCaMP6s [30]. Celui-ci émet de la fluorescence en fonction du niveau de calcium des neurones. En conséquence, le signal calcique mesuré dépend des potentiels d'action générés par les neurones. Malgré certaines études montrant qu'il est difficile de détecter tous les potentiels d'action dans certaines conditions expérimentales [61], le signal ainsi obtenu est tout de même directement relié à l'activité neuronale. Considérant que chaque pixel d'imagerie ne contient pas qu'un seul neurone, mais bien un ensemble de neurones corticaux et sous-corticaux, il s'agit d'un intermédiaire acceptable pour l'activité neuronale.

Le marqueur GCaMP6s est un marqueur à dynamique lente (noté par le *s* pour *slow*), qui possède une constante de montée de $\sigma_{\text{rise}} = 480 \pm 24$ ms et une constante de décroissance de $\sigma_{1/2} = 1796 \pm 73$ ms. Ceci a deux conséquences importantes sur les données recueillies à l'aide du marqueur.

Premièrement, le temps de montée du marqueur fait en sorte que l'activité calcique est mesurée avec un certain délai qui s'écoule entre l'activité réelle du neurone et l'émission de la fluorescence. Il faut donc garder à l'esprit que ce qui est mesuré comme signal neuronal dans nos données est en réalité en retard par rapport à l'activité neuronale du cortex. En conséquence, le décalage temporel qui nous mesurons entre l'activité neuronale et l'activité vasculaire (voir la section 2.1 et la figure 2.3) sous-estime le décalage réel entre les deux signaux.

Deuxièmement, la constante de décroissance élevée fait en sorte que la bande fréquentielle de la dynamique neuronale soit plus basse qu'elle le serait si on disposait d'une mesure directe de l'activité neuronale (étant donné que ce que nous mesurons est l'activité neuronale convoluée avec un noyau de réponse large). On a donc une dynamique de vitesse comparable entre le signal neuronal et le signal vasculaire, et on peut constater à la figure 1.3 que le contenu

fréquentiel est similairement concentré dans les basses fréquences dans les deux cas, malgré une certaine différence dans les plus hautes fréquences.

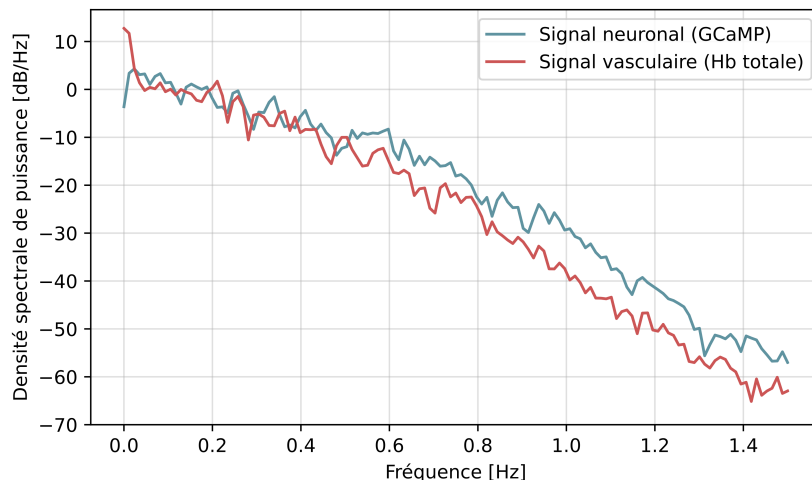


FIGURE 1.3 – Exemple de densité spectrale de puissance des signaux neuronal et vasculaire, pour la souris M396 à 6 mois.

1.2.3 État de vigilance et pupillométrie

En plus des signaux corticaux, qui contiennent l’information neuronale et vasculaire sur l’activité du cortex, il peut être utile de disposer d’un autre moyen de quantifier l’état de la souris au cours de l’imagerie. Notamment, un signal externe au cortex peut fournir de l’information complémentaire sur l’état d’activité de l’animal sans être obtenu directement du cerveau.

L’état de vigilance, aussi appelé état d’éveil ou *arousal*, est une telle mesure qui est souvent utilisée en neurosciences [29, 34, 35]. L’état de vigilance quantifie à quel point le sujet est éveillé, attentif, ou agité ; on observe certaines transitions dans la fonction cérébrale en fonction de l’état de vigilance de l’individu [34, 56]. Dans nos données, une souris peu agitée et très calme devrait avoir un état de vigilance bas, et vice-versa.

En plus de l’électroencéphalogramme, mesure classique de l’état de vigilance [36, 94] mais qui ne nous est pas accessible ici, la noradrénaline (NE) est souvent considérée comme l’un des meilleurs indicateurs de l’état de vigilance. Il s’agit d’un neuromodulateur sécrété dans le locus coeruleus (LC) et qui, en se diffusant dans le reste du cerveau, provoque des changements à l’état de vigilance [34, 105]. Il peut être détecté optiquement à l’aide de marqueurs comme GRAB_{NE} [46], ou alors le système noradrénergique peut être imagé directement [16].

Nous ne disposons cependant pas de mesure de la noradrénaline ni du locus coeruleus, et devons donc procéder par un intermédiaire. Des études ont montré que le diamètre de la pupille est corrélé à l’activation du locus coeruleus et du système noradrénergique (entre environ Pearson

$r = 0,2$ et $r = 0,4$ pour la majorité des neurones du LC mesurés selon [19] ; jusqu'à Spearman $\rho = 0,45$ selon [65]) ainsi qu'à l'état d'éveil [114], ce qui en fait un proxy acceptable pour quantifier l'état de vigilance de l'animal, malgré une certaine variabilité qui rend la correspondance LC-pupille imparfaite [87]. Plus la vigilance est élevée, plus la pupille s'agrandit, et vice-versa. Comme le diamètre absolu de la pupille varie de manière continue et dépend de nombreux facteurs (individu, luminosité et conditions ambiantes, état comportemental, etc.), il est difficile de cibler un seuil unique au-delà duquel on pourrait identifier un état de vigilance chez la souris. En conséquence, plusieurs études qui emploient le diamètre de la pupille comme métrique l'utilisent plutôt pour en calculer la corrélation avec d'autres observations [19, 89] ou pour identifier des changements d'états chez l'animal [70, 71, 98].

Le diamètre de la pupille peut être obtenu à l'aide de la vidéo de surveillance (*monitoring*) de la souris, dont nous disposons. Celui-ci permet de voir un côté de la tête, les vibrisses et un œil durant la séance d'imagerie, et d'observer son comportement. On observe d'ailleurs que la pupille s'agrandit généralement dans les moments où la souris est plus agitée (mouvements faciaux accrus) et inversement, ce qui concorde avec les résultats attendus pour l'état de vigilance.

Le diamètre de la pupille est calculé avec le logiciel *facemap* [115, 119], qui permet de suivre la région de la pupille au fil du temps. Il se base sur un algorithme dans lequel la pupille est isolée du reste de l'œil par un seuillage semi-automatique. L'utilisateur doit sélectionner le seuil d'intensité manuellement (de façon à ne conserver que la pupille) et appliquer des masques là où des réflexions sont présentes dans l'œil, et le logiciel extrait ensuite l'aire de la pupille en fonction du temps automatiquement selon les paramètres choisis. Le diamètre de la pupille est calculé à partir de cette aire en faisant l'approximation d'une pupille circulaire ($d = 2\sqrt{A/\pi}$). Un exemple de sélection de la pupille avec *facemap* se trouve à la figure 1.4, et un exemple de série temporelle de diamètre de pupille se trouve à la figure 1.5.

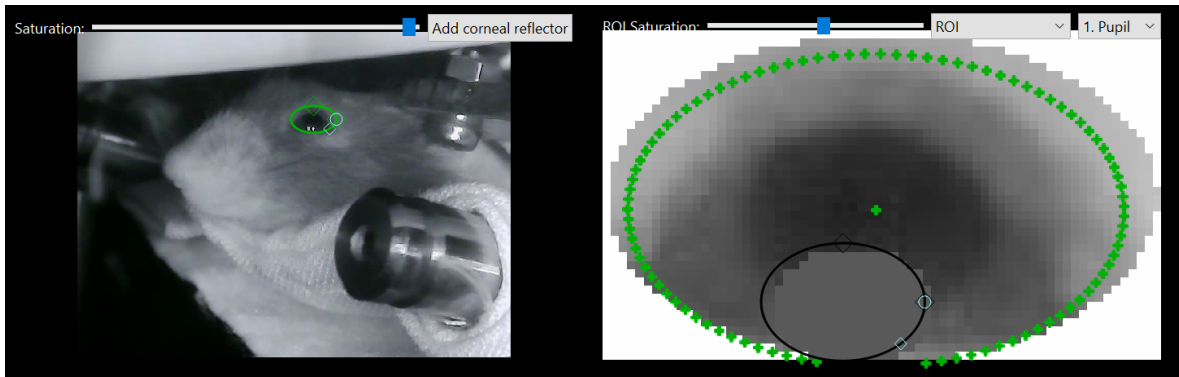


FIGURE 1.4 – Exemple d'utilisation du logiciel *facemap*. Une vidéo de surveillance faciale est chargée dans le logiciel, et la zone de l'œil est sélectionnée (gauche). L'intensité du seuillage est sélectionnée avec le curseur *ROI Saturation* et des réflecteurs (cercle gris) sont utilisés pour retirer les réflexions (droite).

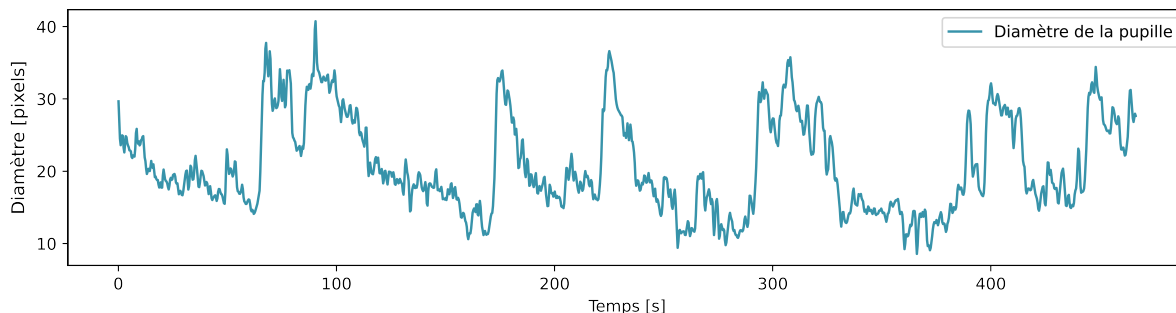


FIGURE 1.5 – Exemple de série temporelle de diamètre de la pupille. Elle est calculée à partir de l’aire de la pupille en fonction du temps donnée par *facemap*, en faisant l’approximation d’une pupille circulaire.

1.3 Bruit et artefacts

Quelques sources de bruit et d’artefacts sont présents dans les données recueillies et doivent être considérées lors de l’analyse.

1.3.1 Pics de mouvement

Bien que les souris aient leur tête fixée sous l’objectif, lors des moments où elles sont très agitées certains pics de mouvement peuvent survenir. Ces pics de mouvement sont difficiles à corriger, car ils se produisent dans l’axe ventral-dorsal du cerveau ; étant donné que la caméra est positionnée directement sur cet axe et que les images acquises sont en deux dimensions, il n’est pas possible de simplement décaler les pixels pour corriger le mouvement (comme on pourrait le faire si les mouvements de la souris étaient latéraux, dans l’axe perpendiculaire à celui de la prise d’images).

Ces pics sont visibles de manière simultanée dans le signal neuronal et vasculaire. Il est toutefois difficile de départager les pics dus au mouvement de ceux qui sont causés par de l’activité simultanée des deux systèmes : comme expliqué à la section 1.2.2 et montré à la figure 2.3, le décalage entre les deux signaux est typiquement très faible, voire nul dans plusieurs cas, ce qui fait en sorte que les pics dus aux signaux se confondent avec ceux qui sont dus au mouvement. Aussi, il est impossible de déterminer simplement en regardant les données si l’activité corticale qui se produit simultanément au mouvement de la souris représente de l’activité corticale réelle ou simplement un artefact de mouvement ; il est vraisemblable que de l’activité corticale se produise au même moment que la souris bouge. Pour ces raisons, certaines techniques communes de correction du mouvement donnent des résultats peu fiables car elles corrigent autant l’activité corticale que le mouvement.

Les données telles qu’elles sont analysées ici n’ont pas subi de correction du mouvement pour cette raison. Une brève discussion d’une technique potentielle de correction du mouvement qui a été implémentée mais qui n’a pas été retenue pour l’analyse se trouve à l’annexe A.

1.3.2 Contamination hémodynamique

Tel qu'expliqué à la section 1.2.1 et représenté à la figure 1.2, l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée ont une absorbance différente, et celle-ci varie en fonction de la longueur d'onde d'imagerie. C'est ce qui rend possible l'imagerie vasculaire en réflectance, mais c'est aussi vrai pour l'imagerie neuronale : la lumière bleue utilisée pour la mesure de l'activité calcique est aussi absorbée de manière différente selon les proportions d'hémoglobine oxygénée et désoxygénée. On peut donc observer certaines fluctuations dans le signal neuronal qui sont dues à l'activité vasculaire plutôt qu'uniquement à l'activité des neurones. Nous appellerons ces artefacts la contamination hémodynamique. Ce bruit est autant perceptible dans les souris exprimant le marqueur GCaMP que dans les souris *wildtype* puisque l'effet dépend uniquement du système vasculaire et pas du fluorophore GCaMP. Ceci explique en partie le fait qu'on observe une certaine corrélation entre le signal vasculaire et le signal neuronal dans ces souris, même si le signal neuronal devrait théoriquement être du bruit (voir la section 3.2 et la figure 3.1).

Le problème est exacerbé par le fait que l'excitation de GCaMP6s se fait avec une DEL bleue à 488 nm, mais que le signal de fluorescence produit est émis dans le vert dans une bande autour d'environ 510 nm [79]. En conséquence, l'absorption et la diffusion du signal n'est pas la même à l'aller (bleu) et au retour (vert), ce qui complique la correction.

La technique employée pour corriger la contamination hémodynamique est de diviser le signal neuronal par le signal obtenu dans le canal vert à 530 nm utilisé pour l'imagerie vasculaire [79]. Étant donné que cette longueur d'onde se trouve environ au centre de la bande d'émission de fluorescence, cette division corrige pour le chemin du retour en vert mais pas pour le chemin d'excitation en bleu. Comme on peut le constater à la figure 1.2, l'absorbance de l'hémoglobine est relativement semblable à 488 et 530 nm, ce qui permet de faire cette approximation pour la correction, même si ce n'est pas parfait.

Pour corriger complètement la contamination hémodynamique, d'autres méthodes plus complexes devraient être implémentées, ce qui n'est pas le cas avec nos données actuelles. Par exemple, il serait possible d'implémenter un modèle de correction hémodynamique qui corrige à la fois dans la bande d'excitation et d'émission de GCaMP6s, ou encore d'utiliser une méthode de séparation des composantes du signal avec une analyse par composantes principales [79].

Il est aussi possible de corriger les artefacts de mouvement et la contamination hémodynamique du signal neuronal en utilisant une lumière à une longueur d'onde dite isobestique, c'est-à-dire à laquelle l'émission du marqueur fluorescent est indépendante de l'activité calcique (typiquement autour de 410 nm pour GCaMP6s) [66]. Les variations mesurées avec le signal isobestique ne sont donc pas reliées à l'activité calcique car elles correspondent uniquement à de la contamination du signal, ce qui permet de corriger le signal neuronal. Une telle source

lumineuse n'est toutefois pas disponible dans le montage expérimental utilisé.

1.4 Pré-traitement des données

À partir de l'imagerie optique, nous obtenons donc trois signaux majeurs qui serviront à l'analyse : le signal vasculaire (dHbT, variation de l'hémoglobine totale), le signal neuronal (relié à la dynamique calcique des neurones par le biais du marqueur GCaMP) et le diamètre de la pupille (relié à l'état de vigilance de la souris).

Les données corticales (vasculaire et neuronal) doivent subir un pré-traitement afin d'être analysables. Les principales étapes de traitement, soit la sélection de la région d'intérêt et l'application de filtres et de normalisation, sont discutées ici. Pour une explication en profondeur de toutes les étapes de traitement de données et du code utilisé pour le faire, voir l'annexe B.

1.4.1 Sélection de la région à analyser

Cette étape se divise en deux parties : une sélection de l'intérieur de la fenêtre corticale, puis une étape de filtrage permettant de retirer les vaisseaux sanguins de surface dans le champ de vue.

Dans un premier temps, l'intérieur de la fenêtre corticale, soit la portion où le cortex est visible, doit être sélectionné. Cette opération est faite manuellement pour chaque souris, car il y a un grand niveau de variabilité quant à la taille et la forme de la fenêtre. Cette étape permet aussi de retirer les zones où se trouvent des imperfections dans la fenêtre (colle, rayures, poils) afin de conserver uniquement la zone qui est bien visible.

Dans un second temps, la présence de vaisseaux sanguins dans la fenêtre corticale affecte les données recueillies. Les artères, veines et capillaires, particulièrement ceux près de la surface, absorbent la lumière excitatrice ainsi que la fluorescence, et affectent en conséquence les signaux d'imagerie, particulièrement le signal neuronal étant donné que les neurones se trouvant sous les vaisseaux sanguins sont essentiellement cachés. Des masques sont appliqués afin de retirer les vaisseaux sanguins du champ de vue. Cette étape nous assure de conserver uniquement les pixels où les deux signaux (vasculaire, neuronal) sont bien visibles et aussi peu altérés que possible. Un problème similaire survient aussi sur les côtés de la fenêtre : en raison du positionnement des DEL sur le système d'imagerie, des zones d'ombres peuvent apparaître sur les côtés de la fenêtre et doivent être retirées puisque leur signal est altéré par rapport au reste de la fenêtre.

Un masque de seuil d'intensité est d'abord appliqué sur les données. Celui-ci applique un seuil constant sur tous les pixels de la fenêtre ; si leur intensité moyenne se trouve sous le seuil, ils sont retirés. Le seuil est ajustable, mais pour la présente analyse une valeur de 0,09

(en termes d’amplitude du signal vert brut) a été choisie après plusieurs essais. Cette valeur permet d’éliminer la majorité des grands vaisseaux sanguins et des zones d’ombre sans empiéter sur les zones environnantes. Étant donné que les données sont mesurées avec des paramètres constants, ce seuil produit des résultats relativement constants d’une souris à l’autre. Une dilatation (*scipy.ndimage.binary_dilation*) d’un pixel est appliqué pour s’assurer de retirer une zone conservatrice autour des vaisseaux sanguins.

Un masque morphologique *top-hat* noir est aussi appliqué sur les données. Celui-ci fonctionne en comparant les données à un élément structurant choisi d’avance. Il élimine ainsi les structures qui sont plus foncées que leur environnement, mais plus petites que l’élément structurant [1]. Contrairement au masque d’intensité qui retire les grandes structures, ce masque est approprié pour retirer les petits vaisseaux sanguins. L’effet combiné de ces deux masques permet d’obtenir une fenêtre corticale où l’effet des vaisseaux sanguins est grandement réduit. L’effet des masques utilisés est exposé à la figure 1.6

Cette procédure retire seulement les vaisseaux sanguins de la surface corticale. Les pixels restants contiennent tout de même de minuscules vaisseaux sanguins qui ne sont pas perceptibles visuellement, mais distribuent le sang partout dans le cortex. C’est d’ailleurs ce qui nous permet d’obtenir un signal vasculaire pour tous les pixels comme nous le faisons pour le signal neuronal.

1.4.2 Traitement par pixel

Finalement, chaque pixel subit un faible lissage gaussien temporel ($\sigma = 1$ et $r = 3$ pas de temps à 3 images par seconde) et est normalisé par un z-score.

Le lissage gaussien permet de réduire l’influence du bruit sur les séries temporelles, mais surtout d’appliquer une courte fenêtre temporelle sur les données (le rayon de $r = 3$ images utilisé équivaut à une seconde). Étant donné que les signaux peuvent avoir un certain décalage entre eux, par exemple l’activité neuronale et l’activité vasculaire, ceci permet de considérer un certain moyennage temporel pour le calcul des corrélations, qui sera détaillé au chapitre 2.

Le z-score permet deux choses. Premièrement, il nous assure que toutes les données seront à une échelle comparable, peu importe la méthode d’imagerie (réflectance ou fluorescence) en plus d’uniformiser chaque pixel qui peut avoir une sensibilité légèrement différente des autres dans le système d’imagerie. Deuxièmement, le z-score nous permet de calculer la connectivité fonctionnelle et la connectivité fonctionnelle dynamique ; ce calcul sera détaillé à la section 2.2.

D’autres étapes sont aussi appliquées, notamment une réduction de la taille des données et une consolidation des fichiers au format HDF5. Une explication détaillée de la marche à suivre pour effectuer le traitement de données, spécifique au code utilisé dans le cadre de ce projet,

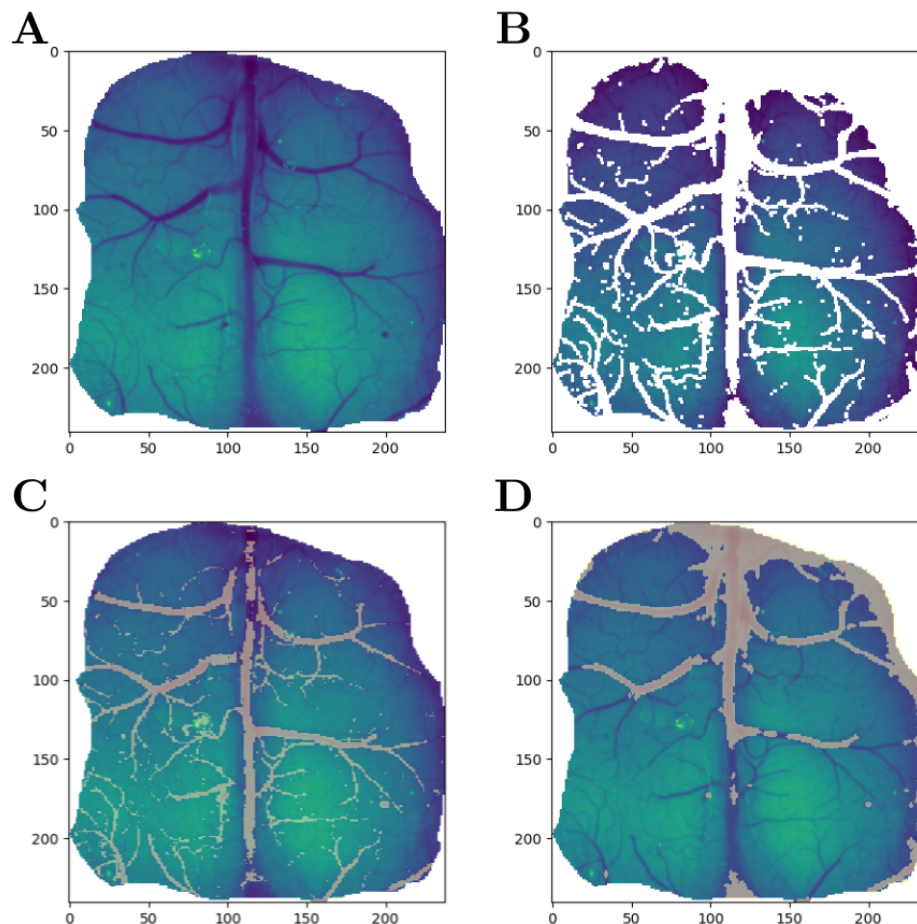


FIGURE 1.6 – Aperçu des masques appliqués sur la fenêtre corticale. **A** : signal vasculaire brut. **B** : signal vasculaire une fois les masques *top-hat* noir (C) et de seuil d'intensité (D) appliqués. **C** : masque *top-hat* noir. **D** : masque de seuil d'intensité.

est disponible à l'annexe B. Une interface graphique a aussi été développée afin d'explorer et de visualiser les données corticales ainsi que d'effectuer le traitement de données de manière interactive (voir annexe C).

1.5 Co-enregistrement cortical

Les signaux corticaux considérés jusqu'à maintenant sont à l'échelle du pixel, dont la taille est d'environ $12\ \mu\text{m}$, ce qui pose deux problèmes majeurs.

Premièrement, cette échelle spécifique est difficilement interprétable physiologiquement :

- l'échelle est similaire à celle du corps cellulaire d'un neurone pyramidal cortical (autour de $16\ \mu\text{m}$ chez la souris [52]) mais est imagé du dessus du cortex, ce qui signifie qu'on peut mesurer dans un seul pixel les effets combinés de neurones provenant de plusieurs couches corticales ;

— l'échelle est significativement plus petite que la taille de régions fonctionnelles corticales. Il est donc difficile d'associer à chaque pixel une interprétation ancrée dans une réalité physiologique.

Deuxièmement, chaque souris ayant une fenêtre et un cortex distincts des autres individus, les formes et tailles des régions d'intérêt peuvent varier entre eux. Il n'est pas assuré qu'un pixel ayant le même emplacement approximatif chez deux souris différentes possède une fonction ou une activité similaire, et la fenêtre corticale de chaque souris est différente et révèle des proportions distinctes de chaque région corticale.

Il est alors difficile d'effectuer l'analyse directe de groupes de souris et de les comparer entre individus, et il est préférable de rapporter les données de chaque souris dans un espace de dimension fixe. Afin d'y parvenir, nous avons recours au co-enregistrement des données. Celui-ci consiste à utiliser une carte (ou atlas) déjà connue des régions corticales de la souris afin d'associer chacun des pixels des données brutes à une région spécifique. On obtient donc une équivalence où chaque pixel est associé à une région, ce qui permet de ramener les données brutes provenant de tous les individus à un espace commun de dimension fixe. L'atlas le plus complet et robuste dont nous disposons pour le cortex de souris est le *Allen Mouse Brain Common Coordinate Framework* de l'*Allen Institute* [125]. Chaque région identifiée par l'atlas, par exemple la région visuelle, motrice ou auditive, possède une fonction qui lui est propre.

Il existe plusieurs façons de positionner adéquatement l'atlas sur le cortex. Certaines méthodes utilisent des marqueurs anatomiques, par exemple le point bregma et le point lambda, pour connaître la position de la fenêtre corticale sur le crâne [27]. D'autres utilisent un recalage fonctionnel, c'est-à-dire une correspondance entre une région corticale qui s'active pendant un stimulus spécifique et une région corticale connue [51] (par exemple, recalculer la zone s'activant lors de la stimulation des vibrisses avec la région somatosensorielle de l'atlas). Puisque nous ne disposons pas de marqueurs anatomiques ni de données d'activation fonctionnelle avec des stimuli, nous devons procéder par recalage approximatif à partir de la taille moyenne du cerveau de la souris.

Le repère le plus aisément repérable est le sinus sagittal, qui permet de positionner l'atlas sur l'axe latéral. Ensuite, sachant que la fenêtre corticale est posée de façon relativement constante sur le crâne des souris, nous utilisons la taille moyenne d'un cerveau de souris afin de fixer la taille de l'atlas et sa position sur l'axe longitudinal. Sachant que la taille du cerveau varie d'environ 11% par rapport à la moyenne [125] entre les individus, on peut placer un atlas de façon approximative sur les données obtenues en respectant la taille moyenne et, tant que nous conservons un faible nombre de régions corticales plutôt que de considérer toutes les divisions possibles, le co-enregistrement approximatif sera suffisant.

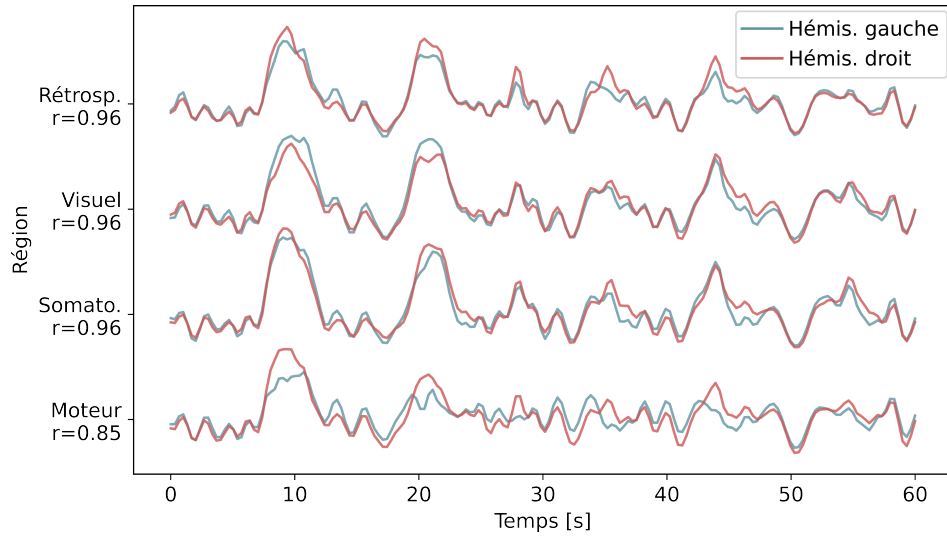


FIGURE 1.7 – Comparaison de signaux de plusieurs régions dans les deux hémisphères. Exemple d’une minute tiré de la souris M396 à 6 mois. Les coefficients de corrélation de Pearson entre les deux hémisphères sont indiqués sur l’axe vertical.

1.5.1 Sélection des régions considérées

Pour la présente analyse, les régions de l’hémisphère droit et gauche seront combinées. Par exemple dans le cas de l’aire motrice, au lieu de considérer « moteur droit » et « moteur gauche », nous combinerons les pixels dans ces deux régions pour former une seule région motrice.

Ce choix est motivé par l’activité très semblable des régions de chaque hémisphère au cours de l’imagerie à l’état de repos (voir la figure 1.7 ; on constate que les signaux des deux hémisphères sont fortement corrélés). Les différences entre chaque hémisphère sont petites, d’autant plus que les deux hémisphères ne sont pas sollicités de manière asymétrique comme il pourrait être le cas par exemple dans une séance d’imagerie impliquant une tâche ou des stimuli latéraux.

Cinq régions majeures sont visibles par la fenêtre corticale : motrice, somatosensorielle, visuelle, rétrospéniale, et associative pariétale. Les régions visibles ainsi que leurs principales divisions sont montrées à la figure 1.8.

Comme on peut le voir à la figure 1.9, les régions n’occupent pas toutes une place équivalente dans la fenêtre corticale une fois correctement alignées. Par exemple, l’aire somatosensorielle supplémentaire (SSs) se trouve totalement à l’extérieur de la fenêtre, et les régions visuelles postéromédiale et primaire sont très peu visibles. De plus, nous devons considérer que les régions près des grands vaisseaux (notamment le sinus sagittal) et près des zones d’ombres des côtés de la fenêtre (typiquement le côté droit à cause du placement des DEL sur le montage) seront éliminées lors du traitement des données (voir la section 1.4.1). Nous combinerons et éliminerons donc certaines régions pour que les régions majeures considérées puissent être

obtenues de manière constante peu importe la souris utilisée. On conserve ainsi les six régions suivantes (qui sont celles montrées à la figure 1.9 C) :

1. Région motrice primaire
2. Région motrice secondaire
3. Région somatosensorielle primaire (ci-après simplement somatosensorielle pour alléger le texte)
4. Région associative pariétale (ci-après simplement associative ; à ne pas confondre avec d'autres régions comme l'aire associative frontale)
5. Région visuelle (combinaison des aires visuelles primaire, postéromédiale et antéromédiale)
6. Région rétrospléniale (combinaison des aires rétrospléniales ventrale, dorsale et agranulaire)

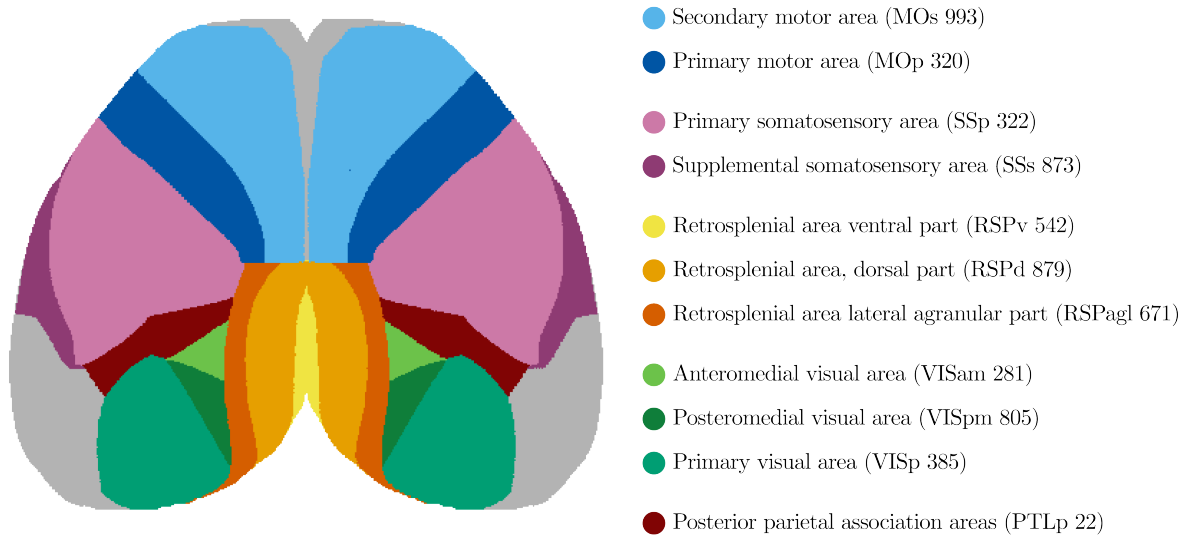


FIGURE 1.8 – Principales régions visibles à travers la fenêtre corticale et leurs divisions majeures. Les régions sont regroupées en cinq groupes : moteur (bleu), somatosensoriel (rose-mauve), rétrosplénial (jaune-orange), visuel (vert) et associatif (rouge), puis par divisions majeures au sein de ces groupes. Les noms des régions tels qu'ils apparaissent dans le *Allen Common Coordinate Framework* ainsi que leurs abréviations et leurs identifiants sont indiqués.

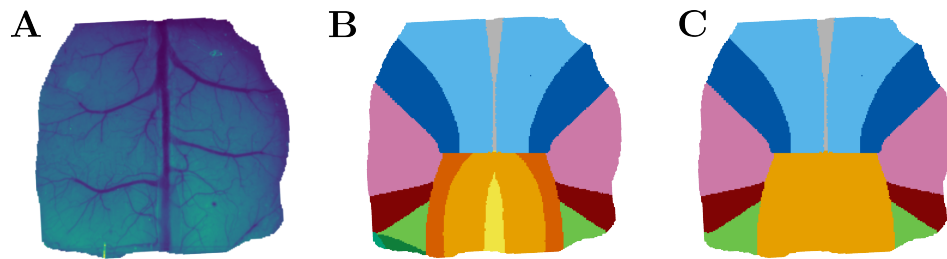


FIGURE 1.9 – **A** : Exemple d'une fenêtre corticale typique. Les bordures et l'extérieur de la fenêtre ont été retirés. **B** : Emplacement des principales régions par rapport à la fenêtre corticale. **C** : Régions conservées une fois certaines régions éliminées ou combinées

Chapitre 2

Analyse

Une fois les signaux mesurés, traités et recalés sur un atlas, une analyse peut en être faite. Nous nous concentrerons sur deux aspects principaux, soit le couplage neurovasculaire et la connectivité fonctionnelle.

Le couplage neurovasculaire représente l'interaction entre le système vasculaire et le système neuronal. Il s'agit d'un concept fréquemment utilisé en neurosciences, mais les définitions varient entre les auteurs et reposent souvent sur une description de haut niveau plutôt que sur une définition mathématique. Puisque le concept est souvent utilisé dans le contexte d'études d'IRMf, il s'appuie fréquemment sur des courbes de réponse typiques du système vasculaire après un pic d'activité neuronal qu'on nomme la réponse hémodynamique. Une courte explication du concept de couplage neurovasculaire est faite dans ce chapitre, puis une définition mathématique en est donnée à partir de critères nous permettant l'analyse de la corrélation entre les signaux corticaux, à la section 2.1.

La connectivité fonctionnelle, quant à elle, est une mesure de la corrélation entre les signaux de différentes régions. Fréquemment employée en analyse des réseaux, elle permet de quantifier comment l'activité d'une région est semblable à celle des autres et d'établir ainsi des liens. Ces liens, dits fonctionnels, reposent uniquement sur la similarité entre les activités (ou fonctions) des différentes régions et n'impliquent pas forcément de lien physique entre elles ; on parlerait dans ce cas de connectivité structurelle, et nous ne disposons pas ici d'un moyen de calculer cette dernière. Des détails sur la connectivité fonctionnelle sont exposés à la section 2.2.

Quelques extensions au concept de connectivité fonctionnelle sont faites dans ce chapitre. D'abord, le concept de connectivité moyenne (section 2.2.1) permet de quantifier à quel point la connectivité est forte en moyenne entre une paire de régions. Ce concept s'étend naturellement à celui de connectivité interne et externe, qui quant à lui permet de comparer à quel point la connectivité au sein d'une région se compare à la connectivité entre cette région et les autres. Ensuite, la notion de connectivité fonctionnelle dynamique [133] est dérivée à partir de la connectivité fonctionnelle statique (section 2.2.2). Celle-ci permet d'étudier l'évolution de la

connectivité au fil du temps et des états de la souris.

Finalement, cette mesure de connectivité fonctionnelle dynamique est employée afin de segmenter en catégories distinctes les états de la souris. On divise ainsi la séance d'imagerie en plusieurs parties, dont chacune représente un état de vigilance ou un état de co-fluctuations corticales spécifique. Les mêmes analyses qui sont faites sur les données entières (couplage neurovasculaire, connectivité fonctionnelle) peuvent ensuite être appliquées sur chacun des segments individuellement. La façon dont cette méthode est appliquée aux données est expliquée, puis son applicabilité aux présentes données est justifiée à la section 2.4.

Tels que mentionnés en avant-propos, des outils d'IA générative ont parfois été utilisés. Leur utilisation dans ce chapitre se limite à la création de scripts de visualisation de données afin de produire des figures, ainsi que des suggestions de fonctions appropriées pour effectuer des calculs ou optimiser le code existant. Les suggestions et le code fourni ont été systématiquement contre-vérifiés. Pour davantage de détails, consulter l'avant-propos.

2.1 Couplage neurovasculaire

Le couplage neurovasculaire est un concept fréquemment utilisé dans la littérature afin de représenter l'interaction entre le système neuronal, constitué d'une multitude de types de neurones excitateurs et inhibiteurs, et le système vasculaire, constitué de vaisseaux sanguins de diverses tailles et des constituants du sang qui y est transporté. Dans sa définition la plus large, parfois nommée unité neurovasculaire, il fait intervenir une grande variété de types de cellules dont les astrocytes, les péricytes, les microgliocytes, les fibroblastes, etc [64, 106]. L'unité neurovasculaire doit son activité à un assemblage complexe de phénomènes dont font partie le flot et le volume sanguin [64], la géométrie corticale [26] et le relâchement de neurotransmetteurs [25], entre autres.

La définition exacte du couplage neurovasculaire varie grandement entre les auteurs. Pour étudier l'interaction entre ces deux systèmes, il est nécessaire de définir clairement ce que nous désignons comme le couplage neurovasculaire. Ne disposant pas de mesures au niveau cellulaire ou concernant les cellules comme les astrocytes ou les péricytes, notre analyse s'arrêtera sur les deux grands systèmes en interaction, soit le système neuronal et le système vasculaire, que notre système d'imagerie permet de mesurer.

Souvent, et plus particulièrement dans les études d'IRMf, le couplage neurovasculaire est représenté par la HRF (*hemodynamic response function*), parfois aussi appelée IRF (*Impulse response function*) [38]. Cette fonction correspond à une réponse vasculaire typique qui survient à la suite d'un pic d'activité neuronale, constituée d'une montée initiale survenant quelques secondes après l'activité neuronale, suivi d'une décroissance jusqu'à l'état de repos (voir la figure 2.1). L'activité des deux systèmes est reliée au point que certains modèles se contentent

de mesurer l'activité vasculaire comme proxy pour l'activité neuronale [126].

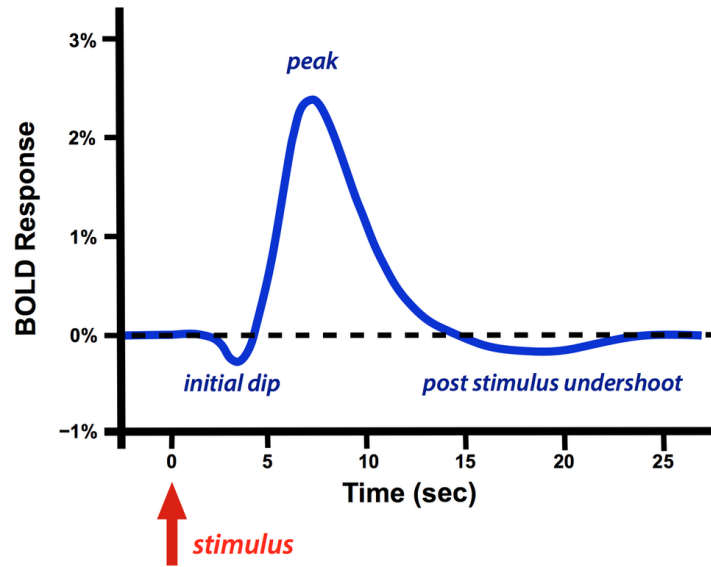


FIGURE 2.1 – Fonction de réponse hémodynamique (HRF) typique telle qu'utilisée en IMRf BOLD. Figure tirée directement de [42]

Cette façon d'illustrer le couplage entre les deux systèmes est répandue dans les études d'IRMf BOLD et du système neurovasculaire en général. Toutefois, comme nous en avons déjà discuté, l'interaction entre les deux systèmes dépend d'une multitude de facteurs qui reposent entre autres sur l'individu, la région étudiée et l'état du sujet, ce qui fait en sorte que le modèle de la HRF à lui seul demeure plutôt simpliste. Nous nous pencherons ici sur certains de ces facteurs, notamment la dépendance spatiale et sur l'état de vigilance du sujet, et aurons en conséquence besoin d'une définition plus flexible du couplage neurovasculaire qui puisse accommoder ces différents facteurs.

La définition du couplage neurovasculaire choisie devrait respecter les critères suivants :

1. Calculable de manière continue au fil du temps, et augmente quand l'activité neuronale est semblable à l'activité vasculaire (et diminue quand les activités se ressemblent moins) ;
2. Tient compte des différences spatiales dans la réponse vasculaire (certaines régions pourraient potentiellement avoir une réponse plus forte que d'autres) ;
3. Tient compte des différences temporelles de réponse vasculaire (certaines régions pourraient potentiellement avoir un délai de réponse plus rapide que d'autres).

Le premier critère peut être respecté en faisant du couplage neurovasculaire une corrélation (Pearson r) ; la corrélation est plus élevée lorsque les signaux neuronal et vasculaire se ressemblent, et plus basse autrement. Le second critère peut être respecté en calculant cette corrélation pour chaque région ou pixel individuellement ; chaque nœud peut ainsi avoir une

corrélation différente et le couplage neurovasculaire est ensuite moyenné sur une certaine région ou un groupe de pixels. Le troisième critère peut être respecté en permettant une certaine fenêtre temporelle pour décaler un signal par rapport à l'autre ; ainsi, on considère la corrélation croisée maximale lorsque les deux signaux sont recalés. On choisit donc la définition suivante :

Définition: Le **couplage neurovasculaire** cortical correspond au coefficient de corrélation de Pearson r maximal entre les signaux neuronal (marqueur calcique) et vasculaire (hémoglobine totale), à un endroit donné du cortex, dans une fenêtre temporelle restreinte.

C'est-à-dire que le couplage neurovasculaire est calculé comme

$$\text{CNV}_i = \max_{\tau_i \in [\tau_1, \tau_2]} \left\{ |r(\text{neur}_i, \text{vasc}_i(\tau_i))| \right\},$$

où CNV_i est le couplage neurovasculaire du nœud i (région, pixel), τ_i est le décalage temporel appliqué au signal vasculaire donnant le plus grand couplage neurovasculaire en valeur absolue dans la fenêtre $[\tau_1, \tau_2]$, r est le coefficient de corrélation de Pearson, et neur_i et vasc_i sont les signaux neuronal et vasculaire respectivement pour le nœud i . Le coefficient de corrélation en valeur absolue est considérée lors du calcul du maximum. Un exemple du calcul du décalage optimal τ pour un pixel i est donné à la figure 2.2. Un exemple du couplage neurovasculaire et du décalage temporel est illustré à la figure 2.3. Nous travaillerons généralement avec le couplage neurovasculaire moyen, que ce soit dans une région spécifique du cortex ou sur l'entièreté de la fenêtre corticale.

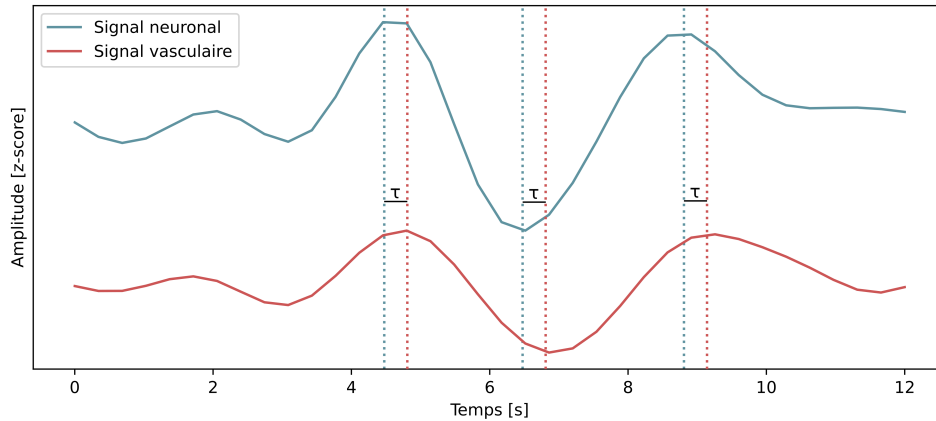


FIGURE 2.2 – Exemple du décalage temporel optimal τ entre le signal neuronal et le signal vasculaire tiré de la souris M322 à 10 mois. Ici le décalage optimal τ est d'un pas de temps = $-1/3$ seconde ($\tau < 0$: le signal neuronal précède le signal vasculaire, donc le signal vasculaire est décalé vers la gauche). Le décalage est calculé indépendamment pour les séries temporelles de chaque pixel et appliqué au signal vasculaire.

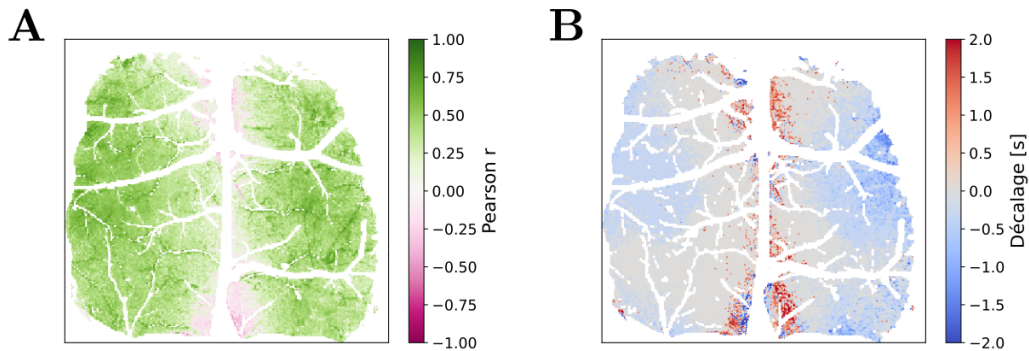


FIGURE 2.3 – **A** : Couplage neurovasculaire (corrélation Pearson r) maximal pour chaque pixel. **B** : Décalage en secondes donnant lieu au couplage neurovasculaire maximal. Un décalage négatif (bleu) signifie que le signal neuronal précède le signal vasculaire. Une fenêtre temporelle de ± 2 secondes a été utilisée.

La fenêtre de décalage maximal considérée ici est de deux secondes, c'est-à-dire que le signal vasculaire peut être devancé ou retardé de jusqu'à deux secondes pour trouver le couplage neurovasculaire maximal. Ce choix est motivé par l'utilisation d'un marqueur calcique à dynamique lente : même si on s'attend à des décalages potentiellement plus élevés, comme on peut par exemple les voir en imagerie BOLD, le délai dans la dynamique de GCaMP6s fait en sorte qu'on observe typiquement des décalages jusqu'à l'ordre d'une seconde environ. Deux secondes ont été utilisées pour permettre un certain jeu dans le décalage, mais comme il peut être observé à la figure 2.3, les décalages obtenus tournent typiquement autour de 0 à 1 s.

2.1.1 Facteurs influençant le couplage neurovasculaire

Plusieurs études s'étant penchées sur le couplage neurovasculaire soulèvent des facteurs que nous pouvons potentiellement nous attendre à observer lors de notre analyse. Nous nous intéressons principalement à la dépendance spatiale du couplage neurovasculaire et à son évolution avec le vieillissement étant donné qu'il s'agit de paramètres présents dans nos données.

La réponse hémodynamique possède une dépendance spatiale connue. Non seulement elle varie selon les régions corticales [64, 111, 124], mais elle varie aussi selon la profondeur corticale étudiée [96], ce qui peut faire varier les observations selon le type d'imagerie utilisée. De plus, la réponse est non locale, ce qui signifie que le couplage neurovasculaire en un point dépend des activités des volumes corticaux à proximité [40], et inversement que le couplage neurovasculaire en un point influence l'activité neurovasculaire environnante [6].

Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas ou peu de correspondance répertoriée dans la littérature entre les régions corticales et leurs paramètres typiques de réponse hémodynamique (amplitude, délai et forme de la réponse, etc.), en dehors du consensus que la réponse peut varier spatialement. Il sera donc particulièrement intéressant de voir comment la relation entre

le système vasculaire et le système neuronal dépend de la région corticale étudiée.

Des résultats préliminaires de [97] montrent que l’efficacité de la modélisation de signaux neuronaux et vasculaires basée sur une fonction de réponse hémodynamique typique dépend de la région étudiée, avec une efficacité maximale pour la région somatosensorielle ; on pourrait donc s’attendre à un fort couplage neurovasculaire dans cette région par rapport aux autres. Chez l’humain, d’autres résultats de [121] et des résultats préliminaires de [57] ont des conclusions semblables et exposent une dépendance du délai de réponse et de la forme de la fonction de réponse sur la région corticale.

De plus, les travaux de [97] montrent une efficacité réduite du modèle sous l’influence de noradrénaline, qui est corrélée avec l’état de vigilance de l’animal. Il est donc possible que le couplage neurovasculaire soit diminué lorsque la pupille de la souris est grande.

Au niveau du vieillissement, il est connu que celui-ci affecte de plusieurs manières le système vasculaire (autant chez l’humain que chez le rat et la souris), par exemple le flot sanguin [37, 76, 82, 130], la géométrie vasculaire [2, 14, 59, 76], la densité de vaisseaux sanguins [37, 72] et la réactivité cérébrovasculaire [8, 43, 93]. Malgré ces effets sur le système vasculaire, bon nombre de travaux montrent que le couplage neurovasculaire en soi est peu affecté par le vieillissement [14, 44, 55, 99].

2.2 Connectivité fonctionnelle

Les séries temporelles mesurées chez les souris contiennent de l’information sur les dynamiques neuronales et vasculaires d’un volume restreint, qu’il s’agisse d’un ou plusieurs neurones, de vaisseaux sanguins ou encore d’une région corticale entière. Bien que l’analyse de chaque unité indépendamment des autres puisse révéler certaines informations, il est souvent intéressant de mettre ces unités en relation les unes avec les autres afin d’obtenir des informations sur la manière dont elles interagissent. Ceci permet d’analyser et de quantifier l’organisation et la connectivité d’un système, soit la manière dont toutes les composantes sont reliées entre elles. Ces liens peuvent être fonctionnels (basés sur l’activité) ou structurels (basés sur un lien physique).

La connectivité fonctionnelle est une métrique couramment utilisée en science des réseaux [12]. Elle découle d’une conception en réseau du système imagé : chacune des unités du système (qu’il s’agisse de neurones, de pixels ou de régions) possède une activité qui lui est propre et qui est distincte de l’activité des autres unités, aussi appelées nœuds dans un contexte de science des réseaux. Cependant, chaque nœud est influencé par les nœuds auxquels il est connecté. À petite échelle, on pourrait par exemple penser à un neurone excitateur qui, en se dépolarisant, excite les neurones postsynaptiques auxquels il est connecté. À plus grande échelle, on pourrait penser à la région visuelle qui s’activerait suite à un flash de lumière,

et qui provoquerait ensuite une activation de la région motrice pour fermer les paupières. La connectivité fonctionnelle est nommée ainsi car elle mesure les liens fonctionnels entre les nœuds, c'est-à-dire à quel point les activités sont semblables.

Une haute connectivité fonctionnelle entre deux nœuds signifie que leurs activités sont similaires, et une basse connectivité fonctionnelle signifie que leurs activités sont différentes. La matrice de connectivité fonctionnelle, obtenue en corrélant l'activité de chaque nœud i avec celle de chaque autre nœud j de manière à obtenir une matrice $N \times N$ où N est le nombre total de nœuds du système, est donc une matrice pleine, pondérée, signée (la corrélation existe pour toutes les paires de nœuds et varie de manière continue entre -1 et 1) et symétrique (la corrélation entre deux signaux x et y est égale à la corrélation entre y et x). Un exemple de matrice de connectivité fonctionnelle pour $N = 3$ régions est donné à la figure 2.4.

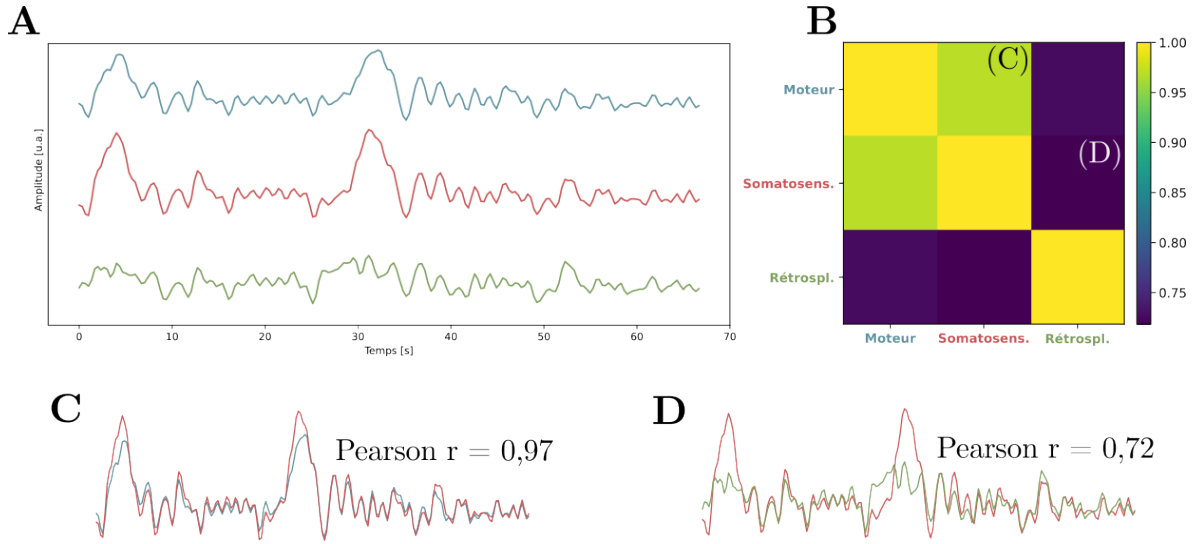


FIGURE 2.4 – **A** : Signaux corticaux pour les régions motrice, somatosensorielle et rétrospéniale. **B** : Connectivité fonctionnelle obtenue à partir des signaux de A. **C** : Signaux des régions motrice et somatosensorielle, avec une corrélation élevée ($r = 0,97$). **D** : Signaux des régions somatosensorielle et rétrospéniale, avec une corrélation moins élevée ($r = 0,72$).

Il est important de noter qu'une connectivité fonctionnelle élevée n'implique pas forcément de lien physique : deux nœuds peuvent avoir une activité similaire même s'ils ne sont pas connectés physiquement de manière directe, tout comme deux nœuds peuvent avoir des activités différentes en dépit d'une connexion directe (on peut penser aux neurones inhibiteurs, par exemple). C'est la connectivité structurelle qui est utilisée pour quantifier l'existence ou non de liens physiques entre les nœuds. Elle se distingue notamment par le fait qu'il s'agit souvent d'une matrice binaire (0 si deux neurones ne sont pas connectés, 1 s'ils le sont), ainsi que dirigée et donc non symétrique (un neurone n'a pas nécessairement de connexions post-synaptiques avec tous ses neurones présynaptiques). Dans ce projet, des données structurelles ne sont pas disponibles ; elles sont généralement obtenues à partir d'IRM de diffusion, de trac-

tographie ou de mesures ex vivo [21, 31, 92]. Nous analyserons donc seulement des matrices de connectivité fonctionnelle, qui peuvent être obtenues à partir des signaux corticaux dont nous disposons.

La matrice de connectivité fonctionnelle (FC) est obtenue en calculant le coefficient de corrélation r de Pearson (ci-après simplement « r » ou « corrélation ») des séries temporelles $\mathbf{s}$ de chaque paire i, j de régions (ou de pixels)

$$FC(\mathbf{s}_i, \mathbf{s}_j) = \text{Pearson } r(\mathbf{s}_i, \mathbf{s}_j) \equiv r(\mathbf{s}_i, \mathbf{s}_j).$$

Notons ici que le nombre d'éléments d'une matrice de FC est le carré du nombre de nœuds considérés. Par exemple, pour une zone d'imagerie rectangulaire de hauteur H et de largeur L , on aurait $H \times L$ pixels, donc une matrice de FC de taille $(H \times L) \times (H \times L)$.

La FC sous sa forme matricielle est donc une matrice où chaque élément se trouve entre -1 et 1 ; un coefficient de -1 signifie que les séries temporelles sont parfaitement anticorrélées, un coefficient de 1 signifie qu'elles sont parfaitement corrélées (activités directement proportionnelles) et un coefficient de 0 signifie qu'il n'y a aucune corrélation entre l'activité des deux régions. Ainsi, on obtient bel et bien une matrice pleine, pondérée, signée et symétrique. Il est nécessaire de considérer ces contraintes lors de l'analyse de la connectivité fonctionnelle étant donné que certaines méthodes sont adaptées à certains types de matrices d'adjacence précis (voir par exemple [100, 101]).

En général, on peut s'attendre à ce que la connectivité fonctionnelle d'une même région dans un hémisphère et dans l'autre soit élevée (par exemple, l'aire motrice droite et l'aire motrice gauche) ; c'est ce qui motive le choix de considérer les régions des deux hémisphères comme une seule région comme expliqué à la section 1.5.1. On peut aussi s'attendre à certaines corrélations élevées lors de tâches ou de stimuli précis : par exemple, lors de la stimulation de la zone des vibrisses (*whisker pad*) chez la souris, on peut observer une activité simultanée des régions somatosensorielle et motrice [28], et donc une connectivité fonctionnelle élevée. Comme nos données proviennent d'imagerie à l'état de repos, nous ne nous attendons pas à distinguer des patrons de connectivité propres à des réponses de stimuli ou des états comportementaux précis, mais plutôt des groupes de régions qui peuvent être fortement corrélées même à l'état de repos ; voir la section 2.4.2 pour une brève discussion des patrons de connectivité corticale.

N.B. : Puisqu'elles contiennent $N \times N$ éléments, où N est le nombre de pixels de la fenêtre corticale, les matrices de connectivité fonctionnelle calculées avec la librairie *NumPy* de Python peuvent être très grandes : jusqu'à 10 gigaoctets pour une matrice de connectivité fonctionnelle complète avec des valeurs à virgule flottante. Une parcellisation de 10 pixels $\times$ 10 pixels est donc appliquée sur les données avant de calculer la connectivité fonctionnelle afin de réduire le temps de calcul et les besoins en mémoire vive.

2.2.1 Connectivité moyenne

Il est souvent intéressant de considérer la connectivité fonctionnelle d'un ensemble de nœuds (neurones, pixels, régions) plutôt que pour chaque nœud individuellement. Ceci peut nous donner un aperçu de comment la connectivité opère au niveau du groupe et par rapport à d'autres groupes. Nous définirons ici la connectivité moyenne, c'est-à-dire la moyenne des valeurs de connectivité fonctionnelle pour un ensemble de points donné. Pour un ensemble de N nœuds ayant un signal $\mathbf{s}_i$, la connectivité moyenne $\bar{r}$ de l'ensemble est calculée comme

$$\bar{r} = \frac{1}{N(N+1)/2} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^i r(\mathbf{s}_i, \mathbf{s}_j).$$

Seulement une moitié de la matrice de connectivité fonctionnelle est moyennée pour éviter le surcomptage, étant donné qu'elle est symétrique (d'où la normalisation par $N(N+1)/2$). Les éléments sur la diagonale sont ici inclus car lorsqu'on considère la connectivité fonctionnelle dynamique (qui sera détaillée à la section 2.2.2), ils ne sont pas toujours égaux à 1.

L'une des principales utilités de cette mesure est de considérer la connectivité fonctionnelle moyenne entre tous les pixels d'une même région, et entre les pixels de régions distinctes. Il s'agit d'une mesure utile car elle quantifie à quel point la connectivité est forte au sein d'un groupe par rapport à la connectivité avec les autres groupes. En calculant la connectivité moyenne pour chaque région, on obtient une matrice de connectivité moyenne R de taille $M \times M$ où M est le nombre de régions, dont un exemple se trouve à la figure 2.5.

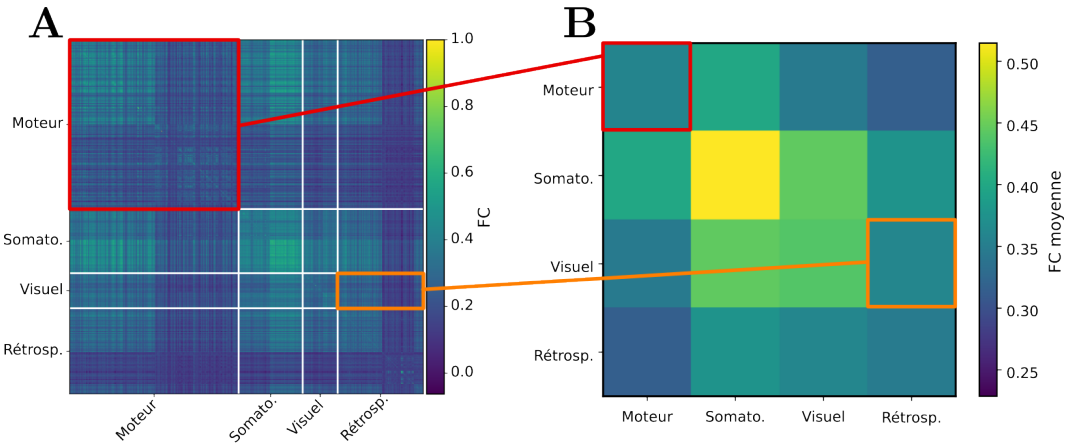


FIGURE 2.5 – **A** : Matrice de connectivité fonctionnelle (FC) divisée par régions majeures. **B** : Matrice de connectivité moyenne (R) divisée par régions majeures. Un élément de cette matrice est obtenu en prenant la moyenne des éléments de la matrice de connectivité fonctionnelle. La ligne rouge indique un exemple de connectivité moyenne au sein d'une région (moteur vers moteur) et la ligne orange indique un exemple de connectivité moyenne entre deux régions (visuel vers rétrospénial).

À partir de la matrice de connectivité moyenne (figure 2.5 B), on obtient la connectivité interne de chaque région en prenant la valeur se trouvant sur la diagonale, et la connectivité externe

en prenant la moyenne des éléments hors diagonale de la colonne, tel que

$$\bar{r}_{\text{int},m} = R_{m,m}$$

$$\bar{r}_{\text{ext},m} = \frac{1}{M-1} \sum_{\substack{p=1 \\ p \neq m}}^M R_{p,m}$$

pour M régions, avec R la matrice de connectivité moyenne, $\bar{r}_{\text{int},m}$ la connectivité interne de la région m et $\bar{r}_{\text{ext},m}$ la connectivité externe de la région m . On obtient une valeur de connectivité moyenne interne et une valeur de connectivité moyenne externe par région. Un exemple est exposé à la figure 2.6.

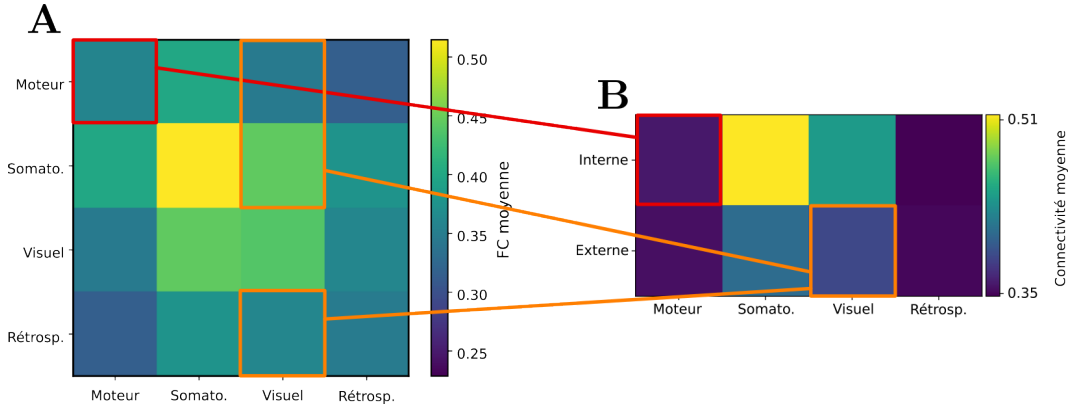


FIGURE 2.6 – **A** : Matrice de connectivité moyenne divisée par régions majeures. Il s'agit de la même matrice qu'obtenue à la figure 2.5 B. **B** : Matrice de connectivité interne et externe. Les éléments de connectivité interne (ligne rouge) correspondent aux éléments sur la diagonale de A, et les éléments de connectivité externe (lignes oranges) correspondent à la moyenne des éléments hors diagonale.

2.2.2 Connectivité fonctionnelle dynamique

La connectivité fonctionnelle est calculée sur l'entièreté de la période d'imagerie. En effet, le coefficient de corrélation r de Pearson quantifie la covariance entre deux séries temporelles tel que

$$r(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \frac{\text{Cov}(\mathbf{x}, \mathbf{y})}{\sigma_x \sigma_y}.$$

Pourtant, on pourrait s'attendre à ce que la connectivité fonctionnelle puisse varier d'un moment à un autre. Par exemple, l'état de vigilance de la souris pourrait faire en sorte que certaines régions soient plus fortement corrélées à certains moments plutôt que d'autres, ou alors on pourrait avoir des corrélations plus élevées lorsque certaines régions particulières sont sollicitées simultanément. La définition courante de la connectivité fonctionnelle ne permet pas d'analyser ce genre d'hypothèse.

Certaines méthodes ont été suggérées pour permettre d'analyser la connectivité fonctionnelle à des moments spécifiques. Par exemple des méthodes avec des fenêtres glissantes, où un certain nombre de pas de temps autour du point d'intérêt sont moyennés pour effectuer le calcul de la connectivité fonctionnelle. Le désavantage notable de ces méthodes est qu'elles ne permettent pas d'isoler des instants spécifiques, et conviennent peu lorsqu'il s'agit de considérer des facteurs qui peuvent fluctuer rapidement dans le temps comme l'état de vigilance.

Une méthode a été proposée par [45, 133] afin d'obtenir une mesure de la connectivité fonctionnelle à une résolution temporelle égale à celle des données brutes. Cette métrique, appelée connectivité fonctionnelle dynamique (dFC), a l'avantage de pouvoir être obtenue en disposant d'un seul pas de temps de la série temporelle à la fois. L'essentiel de la méthode exposée ici provient de [45, 133].

Les données permettant de calculer la connectivité fonctionnelle sont des séries temporelles de signaux corticaux. Elles peuvent être représentées par une matrice S de dimension $T \times N$, où T est le nombre de pas de temps et N est le nombre de nœuds.

$$S = \begin{bmatrix} s_{1,1} & s_{1,2} & \cdots & s_{1,N} \\ s_{2,1} & s_{2,2} & \cdots & s_{2,N} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ s_{T,1} & s_{T,2} & \cdots & s_{T,N} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{s}_1 & \mathbf{s}_2 & \cdots & \mathbf{s}_N \end{bmatrix}$$

la matrice de connectivité fonctionnelle FC, de dimension $N \times N$, est donnée par

$$FC = \begin{bmatrix} r(\mathbf{s}_1, \mathbf{s}_1) & r(\mathbf{s}_1, \mathbf{s}_2) & \cdots & r(\mathbf{s}_1, \mathbf{s}_N) \\ r(\mathbf{s}_2, \mathbf{s}_1) & r(\mathbf{s}_2, \mathbf{s}_2) & \cdots & r(\mathbf{s}_2, \mathbf{s}_N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ r(\mathbf{s}_N, \mathbf{s}_1) & r(\mathbf{s}_N, \mathbf{s}_2) & \cdots & r(\mathbf{s}_N, \mathbf{s}_N) \end{bmatrix}.$$

Tel que mentionné ci-haut, le coefficient de corrélation de Pearson $r(\mathbf{x}, \mathbf{y})$ peut être exprimé en fonction de la covariance des deux séries temporelles $\mathbf{x}$ et $\mathbf{y}$ et de leur écart type

$$r(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \frac{\text{Cov}(\mathbf{x}, \mathbf{y})}{\sigma_x \sigma_y}.$$

Sachant que la covariance peut être exprimée comme

$$\text{Cov}(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \frac{1}{T-1} \sum_{t=1}^T (x_t - \bar{x})(y_t - \bar{y}),$$

où le $T-1$ est utilisé pour obtenir un estimateur non biaisé, x_t est le t -ème élément de la série temporelle $\mathbf{x}$ et $\bar{x}$ est sa moyenne, alors le coefficient de corrélation s'exprime comme

$$r(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \frac{\sum_{t=1}^T (x_t - \bar{x})(y_t - \bar{y})}{(T-1)\sigma_x \sigma_y}.$$

On reconnaît ici l'expression du z-score de chaque signal :

$$Z_{x,t} = \frac{x_t - \bar{x}}{\sigma_x}$$

qu'on peut substituer pour obtenir

$$r(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \frac{\sum_{t=1}^T Z_{x,t} Z_{y,t}}{T-1}. \quad (2.1)$$

Donc, le coefficient de corrélation r de Pearson correspond à la valeur moyenne du produit des séries temporelles dont on a calculé le z-score.

L'équation 2.1 est d'une grande utilité : en omettant de faire le moyennage temporel, elle permet de développer dans le temps l'évolution de la FC et d'obtenir des matrices de connectivité fonctionnelle dynamique (dFC)

$$FC_{i,j,t} \equiv dFC_{i,j,t} = Z_{i,t} Z_{j,t}.$$

Avec i et j les indices des nœuds et t le pas temporel. On obtient donc une matrice de dFC distincte pour chaque pas de temps, et la matrice de FC complète s'obtient en prenant la moyenne temporelle de toutes les matrices de dFC :

$$\mathbf{FC} = \frac{1}{T-1} \sum_{t=1}^T \mathbf{dFC}_t. \quad (2.2)$$

On remarque une nuance importante avec l'équation 2.2 : au lieu de moyennner sur la série temporelle entière, on pourrait choisir de moyennner sur un sous-ensemble de pas temporels choisis délibérément. C'est ce qui nous permettra, à la section 2.3, de considérer et comparer la connectivité fonctionnelle dans plusieurs états différents en sélectionnant spécifiquement les pas temporels associés à un état ou un autre.

2.2.3 Série temporelle de co-fluctuations

Nous avons mentionné à la section précédente qu'il était utile de disposer de matrices de dFC afin de pouvoir étudier l'évolution de la FC selon des métriques qui varient rapidement, comme l'état de vigilance. Cette dernière est une métrique que nous obtenons à partir d'un facteur physiologique externe au cortex, soit la pupille, mais qu'en est-il des signaux corticaux eux-mêmes ?

Eux aussi varient rapidement et peuvent servir à délimiter les moments où l'activité du cerveau est intense par rapport aux moments où elle est plus basse. On voudra ainsi séparer les moments que nous appellerons de « hautes co-fluctuations », c'est-à-dire les moments où beaucoup de nœuds varient simultanément dans la même direction, des moments de « basses co-fluctuations » où l'activité globale est faible ou varie dans des directions opposées (basses corrélations). Cette méthode s'inspire de celle employée par [45, 133].

La définition obtenue pour la dFC nous permet de définir une telle métrique, nommée série temporelle de co-fluctuations (CTS), en prenant la racine de la somme des carrés (RSS, *root sum of squares*) des éléments de chaque matrice de dFC

$$CTS_t = \sqrt{\sum_{i,j} dFC_{i,j,t}^2}.$$

Le terme co-fluctuations est employé car la CTS quantifie à quel point un grand nombre de nœuds varient dans la même direction. Son amplitude est élevée lorsque plusieurs nœuds (régions, pixels, etc.) varient dans la même direction simultanément, et basse lorsque l'activité globale est basse ou qu'un faible nombre de nœuds varient dans la même direction. Le carré nous assure de considérer seulement l'amplitude des co-fluctuations et non pas leur direction (augmentation ou baisse d'activité), de sorte que la CTS est toujours non-négative.

Lorsque calculé numériquement, on considère une seule moitié de la matrice de dFC étant donné qu'elle est symétrique, et on en exclut la diagonale étant donné qu'elle ne contient aucune information sur les co-fluctuations entre différents nœuds. Un exemple de CTS obtenue à partir du signal neuronal ainsi que des états corticaux qui y sont associés se trouve à la figure 2.7.

2.3 Segmentation des données

L'utilité principale des séries temporelles de co-fluctuations (CTS) et des matrices de connectivité fonctionnelle dynamique (dFC) est d'obtenir des mesures dynamiques du système en fonction du temps. Comparativement à d'autres méthodes, par exemple celle des fenêtres glissantes, ces données sont à la même résolution temporelle que l'imagerie optique, et elles permettent en conséquence d'obtenir un portrait plus précis de la façon dont la dynamique du système évolue au fil du temps.

Dans un contexte où nous souhaitons étudier l'interaction entre plusieurs composantes d'un même système, cette méthode est particulièrement intéressante. Puisqu'elle permet d'analyser la connectivité à chaque pas de temps, il est possible de se baser sur des critères donnés afin de catégoriser lesdits pas de temps individuellement. Par exemple, il serait possible de séparer les pas de temps basés sur des stimuli externes, des états comportementaux, des niveaux de vigilance ou encore des niveaux d'activité corticale. On se retrouverait alors avec plusieurs « segments » contenant chacun un ensemble de matrices de dFC associées à l'état représenté par le segment.

Ici, étant donné que les données proviennent d'imagerie à l'état de repos, nous ne disposons pas de mesure de stimuli externes ou d'états comportementaux. Nous disposons de deux métriques pour segmenter les séries temporelles et les catégoriser en états distincts : les co-fluctuations

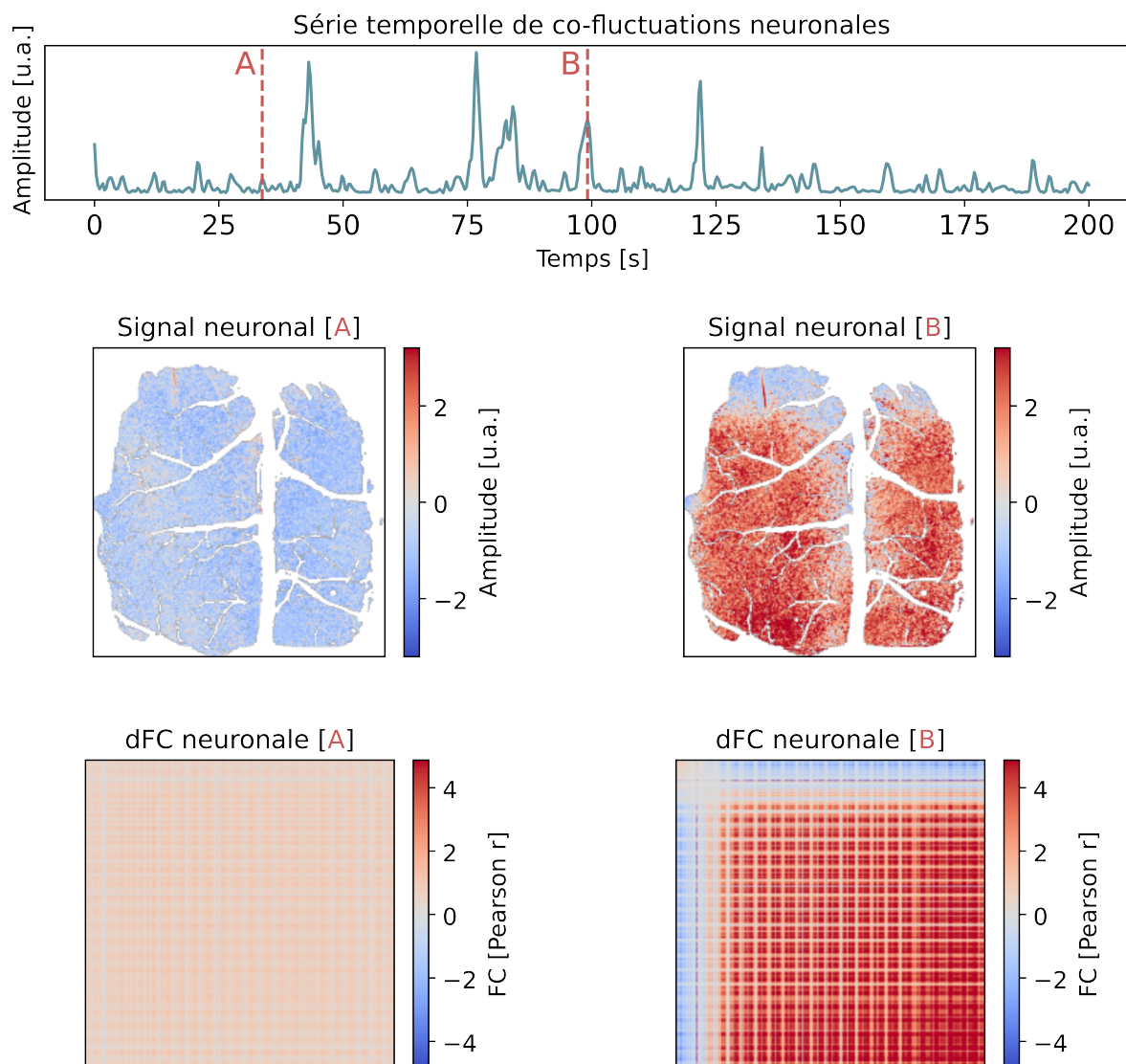


FIGURE 2.7 – Exemple de série temporelle de co-fluctuation neuronale et de matrice de connectivité fonctionnelle dynamique tiré de la souris M396 à 6 mois.

Première rangée : Série temporelle de co-fluctuations neuronales. Notons que les co-fluctuations sont toujours non-négatives peu importe la direction dans laquelle l’activité varie.

Deuxième rangée : Signal neuronal dans la fenêtre crânienne aux moments A (basses co-fluctuations) et B (hautes co-fluctuations) indiqués sur la série temporelle.

Troisième rangée : Matrice de connectivité fonctionnelle dynamique (dFC) aux moments A et B.

neuronales (obtenues par la CTS neuronale) ainsi que l’état de vigilance (approximé par le diamètre de la pupille).

La segmentation agit sur l’amplitude de la série temporelle. Les pas de temps où l’amplitude de la série temporelle est élevée se retrouvent dans un segment, et les pas de temps où l’amplitude est basse se retrouvent dans un autre segment de manière que chaque segment représente un

temps total équivalent. Autrement dit, dans un cas à deux segments (ce qui est utilisé ici) l'amplitude médiane de la série temporelle sert de délimitation de sorte que la série temporelle se retrouve séparée en deux segments de tailles égales. Un exemple de segmentation en deux segments via le diamètre de la pupille est exposé à la figure 2.8.

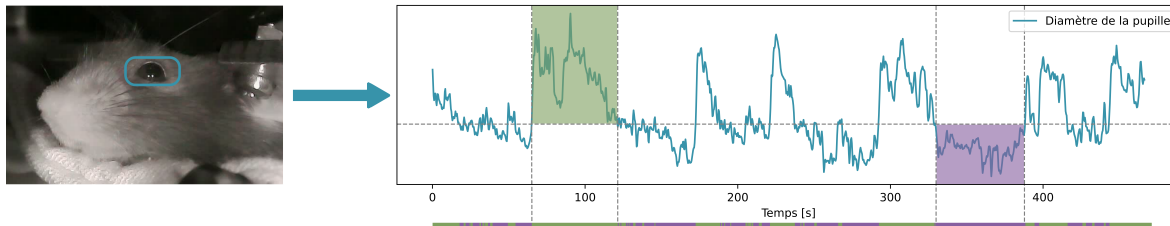


FIGURE 2.8 – Exemple de série temporelle de diamètre de pupille segmentée selon son amplitude. **Gauche** : prise de vue de la souris pendant la séance d'imagerie. Le diamètre de la pupille est calculé avec le logiciel *facemap*. **Droite** : le diamètre de la pupille séparé en deux segments. Chaque pas de temps appartient soit au segment élevé (vert), ou au segment bas (mauve), comme qu'indiqué par la barre de couleur au bas, de sorte que chaque segment représente une durée totale équivalente.

Une fois les pas de temps catégorisés dans l'un ou l'autre des segments, la segmentation peut être utilisée pour diviser d'autres données comme les matrices de dFC ou le couplage neurovasculaire.

Une fois les données segmentées, les mêmes analyses qui sont faites avec les données complètes, par exemple l'analyse de la connectivité fonctionnelle ou du couplage neurovasculaire, peuvent être faites sur chacun des segments individuellement plutôt que sur les données entières. Par exemple, dans le cas de la connectivité fonctionnelle, au lieu de moyenner sur la séance d'imagerie entière, on moyennera les matrices de dFC appartenant à un seul des deux segments, afin de représenter la connectivité fonctionnelle uniquement pour cet état. Ainsi, on peut analyser s'il existe des différences majeures au niveau de l'activité corticale en fonction des différents états de la souris.

2.4 Validité de la méthode de segmentation

Considérons des données qui auraient été divisées en deux segments par la série temporelle de co-fluctuations neuronales. Dans ce cas, 50% des pas de temps se retrouvent dans un segment correspondant aux moments où les co-fluctuations neuronales sont élevées (l'activité de plusieurs nœuds varie simultanément), et les 50% des pas de temps restants se retrouvent dans un segment où les co-fluctuations neuronales sont basses (peu de variation dans l'activité, ou alors les variations se produisent dans des directions différentes).

Nous pouvons, une fois ces données segmentées, effectuer les analyses sur chacun des segments individuellement. Le couplage neurovasculaire entre le signal vasculaire et neuronal est calculé, et la connectivité moyenne est aussi calculée pour chaque segment. Souvent, on remarquera

un couplage neurovasculaire plus élevé et une connectivité accrue dans le segment de hautes co-fluctuations, et des valeurs plus basses dans le segment de basses co-fluctuations, comme il sera expliqué au chapitre 3.

On peut raisonnablement s'interroger à savoir si ces résultats sont induits par la méthode elle-même. En effet, si on considère des moments où les régions corticales fluctuent simultanément et de manière forte, on pourrait s'attendre à ce que la corrélation entre les signaux soit plus élevée et que la connectivité le soit aussi. La méthode de segmentation vaut-elle alors la peine d'être utilisée, ou alors fait-elle simplement apparaître des résultats évidents ?

Autrement dit : les résultats observés découlent-ils de manière triviale de la méthode employée ? Penchons-nous sur le cas du couplage neurovasculaire, soit la corrélation entre le signal neuronal et le signal vasculaire. On peut imaginer deux cas où les résultats ne découlent pas forcément de la segmentation des séries temporelles :

- L'activité neuronale et l'activité vasculaire ne sont pas liées, ou sont seulement faiblement liées. Dans ce cas, l'amplitude des co-fluctuations de l'un donne peu ou aucune information sur l'autre. Ce n'est évidemment pas le cas ici : la littérature montre une forte dépendance de l'un sur l'autre, et des fortes co-fluctuations neuronales entraînent généralement des co-fluctuations vasculaires. Il est logique qu'en considérant les hautes co-fluctuations de l'un, la corrélation entre les deux augmente.
- Le comportement à hautes co-fluctuations diffère entre la dynamique neuronale et la dynamique vasculaire ; des hautes co-fluctuations n'impliquent donc pas une grande corrélation.

Cette deuxième possibilité est particulièrement intéressante étant donné qu'on souhaite analyser la relation entre les deux systèmes. On sait aussi que l'activité du système neuronal et du système vasculaire dépendent d'une multitude de facteurs indépendants qui rendent leur dynamique complexe. Si cette hypothèse s'avère, alors il est bel et bien possible d'obtenir des corrélations basses même lorsque les co-fluctuations sont élevées, et vice versa, ce qui rendrait effectivement nos résultats non triviaux.

Validons si cette hypothèse de comportement divergeant à hautes co-fluctuations peut donner des basses corrélations. On peut aisément imaginer deux fonctions strictement croissantes qui ont un comportement similaire à basse amplitude et différent à haute amplitude. Prenons un exemple simple avec une fonction linéaire $f(t) = t$ et une sigmoïde dont le point d'inflexion se trouve à l'origine $g(t) = 2/(1 + e^{-10t}) - 1$ (figure 2.9).

À basse amplitude le comportement des deux fonctions est similaire et la corrélation est élevée, mais à haute amplitude la corrélation est plus basse. On peut imaginer qu'un cas semblable se produise avec nos données : une amplitude de co-fluctuations élevée ne garantit pas que la corrélation entre les activités sera elle aussi plus élevée. Bien que ceci soit un contre-exemple facile qui nous montre qu'une grande amplitude n'implique pas forcément une grande

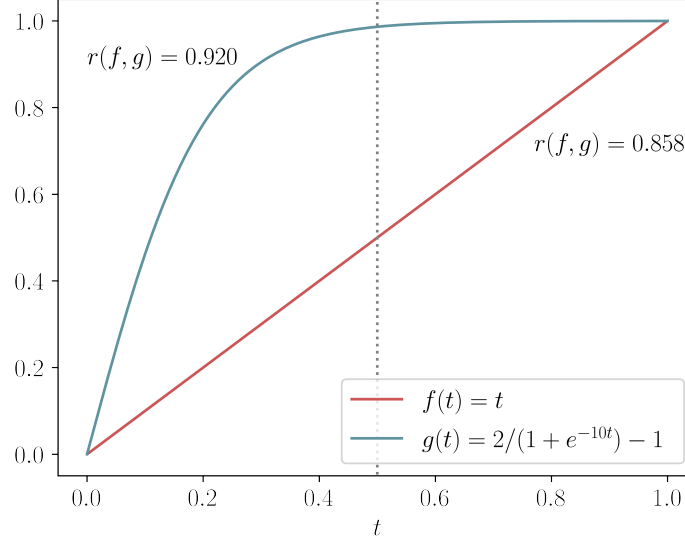


FIGURE 2.9 – Exemples de fonctions qui ont une corrélation plus basse à haute amplitude.

corrélation, il est difficilement généralisable à un système dont chaque nœud a une activité très différente et bruitée.

Il est toutefois possible de trouver des contre-exemples à même nos données et la figure 2.10 en montre un exemple. On y remarque que, typiquement, les pics de co-fluctuations neuronales et vasculaires sont approximativement simultanés. Il est donc attendu que le couplage neurovasculaire soit plus élevé à ces instants, ce qui signifie qu'en général de hautes co-fluctuations neuronales vont signifier un couplage neurovasculaire accru. Cependant, on peut cibler des moments où l'inverse est vrai. Ici, une section de 48 secondes (10% de la durée totale) a été sélectionnée et séparée en deux segments (bas de la figure 2.10). Dans cette portion de la séance d'imagerie, le couplage neurovasculaire est plus bas lorsqu'on considère le segment de haute co-fluctuations, et inversement pour le segment de basses co-fluctuation.

On constate que ces résultats ne sont donc pas induits trivialement par la méthode puisque nous sommes en mesure de trouver des contre-exemples. Cette analyse vaut la peine d'être faite, et ce même si on peut raisonnablement penser que le couplage neurovasculaire devrait globalement suivre les co-fluctuations neuronales.

2.4.1 Différence entre le segment de co-fluctuations neuronales et le segment de vigilance

Finalement, il est raisonnable de s'interroger sur la différence entre les segments formés par les hautes co-fluctuations neuronales et les segments formés par le grand diamètre de pupille. Après tout, il pourrait être raisonnable de penser que la vigilance pourrait être étroitement

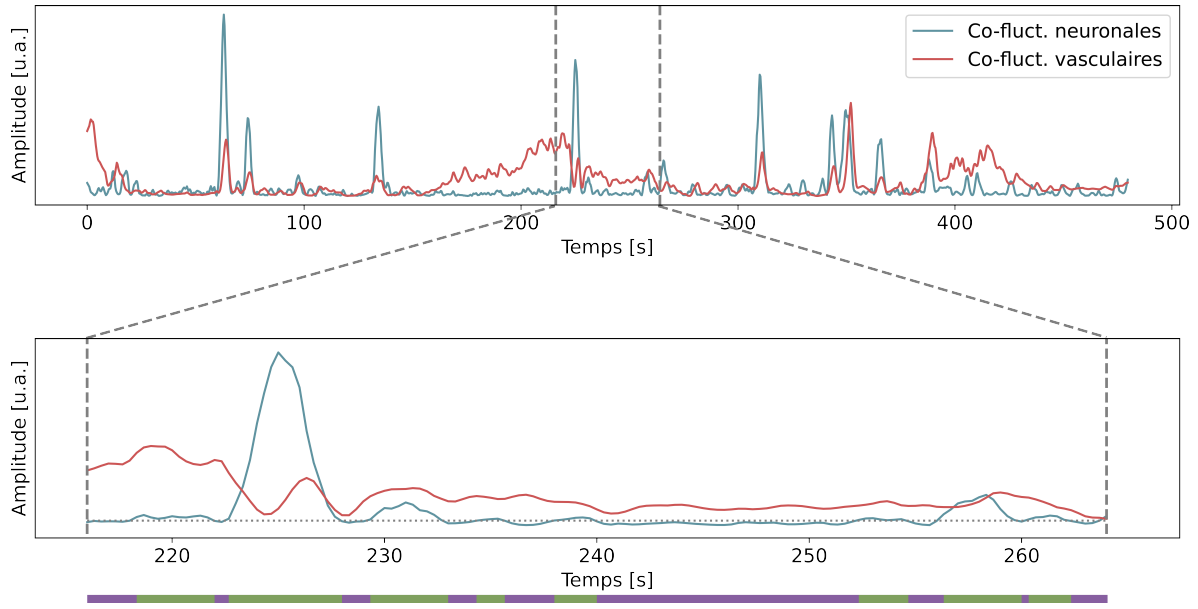


FIGURE 2.10 – Séries de co-fluctuations neuronale (bleu) et vasculaire (rouge) pour la souris M396. **Haut** : série complète. **Bas** : section agrandie de la série complète, correspondant à 10% de la durée complète. Les moments associés au mauve correspondent au segment de basses co-fluctuations neuronales, et les moments associés au vert correspondent au segment de hautes co-fluctuations neuronales, comme à la figure 2.8.

liée à l'activité neuronale, et qu'en conséquence les deux segments seraient très similaires. Si tel était le cas, on observerait un chevauchement considérable des pas de temps contenus dans l'un et l'autre de ces segments, puisqu'un pas de temps de haute amplitude de co-fluctuations aurait aussi une haute probabilité de correspondre à un moment de vigilance élevée.

Au contraire, s'il n'y avait aucun lien entre ces deux états (que ce soit un lien positif ou négatif), lorsque deux segments sont délimités, on devrait s'attendre à ce que 50% des pas temporels se chevauchent en moyenne, ce qui correspondrait à un hasard parfait. Or, on observe les résultats suivants sur les 36 jeux de données provenant de souris transgéniques :

Entre les instants de hautes co-fluctuations neuronales et les instants de haute vigilance : entre 45,97 et 60,69% de chevauchement (moyenne de 54,82%)

On obtient des valeurs de chevauchement plus hautes que le hasard, mais tout de même sous la barre des 60% en moyenne. Ceci suggère que s'il y a un certain lien entre eux, les états délimités par les hautes co-fluctuations neuronales et ceux délimités par la vigilance élevée représentent tout de même des états différents et il convient de les traiter comme deux mesures distinctes. On peut répéter la même démarche pour comparer les co-fluctuations neuronales et vasculaires et faire un constat similaire :

Entre les instants de hautes co-fluctuations neuronales et les instants de hautes

co-fluctuations vasculaires : entre 52,78 et 64,86% de chevauchement (moyenne de 57,94%)

2.4.2 La connectivité dans le cortex de la souris

Plusieurs études se sont déjà penchées sur la connectivité du cortex de la souris, autant au niveau structurel (existence de liens physiques entre les neurones/régions, [68, 92]) que fonctionnel (corrélation de l'activité de plusieurs neurones/régions). Le lien entre la structure et la fonction du cerveau fait d'ailleurs l'objet de nombreuses études [15, 54, 88, 112, 117] qui montrent que ces deux mesures de la connectivité peuvent être similaires dans certaines régions [88], par exemple dans les régions sensorimotrices [15], alors qu'elles s'écartent parfois dans d'autres [54].

Peu importe la méthode utilisée pour étudier la connectivité, les mesures de connectivité permettent de mettre en évidence l'existence de modules ou de communautés dans le cortex, soit des groupes constitués de régions ayant des liens forts entre elles et des liens plus faibles avec les autres régions. Souvent, ces communautés sont détectées avec des algorithmes de partitionnement (*clustering*) qui maximisent la modularité, c'est-à-dire qui maximisent la densité des connexions au sein des communautés tout en la minimisant entre les différentes communautés [90], comme la méthode de Louvain [101].

L'une des communautés fréquemment observées dans le cortex de la souris est constituée des aires motrice et somatosensorielle, auxquelles s'ajoutent parfois d'autres régions rapprochées comme l'aire associative frontale [73] (à ne pas confondre avec l'aire associative pariétale que nous considérons dans le co-enregistrement), l'aire orbitale ou l'aire viscérale [18]. Ce groupe de régions est souvent dénommé aire sensorimotrice ou encore réseau cortical latéral (*lateral cortical network*, [15, 73]) et met en lumière l'interaction forte qui existe entre les aires sensorielles et les aires motrices. Entre autres, l'activité de l'aire somatosensorielle peut provoquer des réponses motrices [108], joue un rôle important dans l'apprentissage de tâches motrices [62], et l'inhibition de l'aire somatosensorielle primaire conduit à inhibition de l'activité du cortex moteur primaire [62, 91].

Certaines autres des régions considérées ici se retrouvent groupées ensemble au sein de communautés, comme les aires rétrospéniale et associative pariétale [73], auxquelles se joint parfois aussi l'aire visuelle [135]. Comparativement à la communauté sensorimotrice qui est bien documentée, la composition de celle-ci est plutôt variable et moins discutée dans la littérature. L'aire visuelle fait souvent l'objet d'une étude particulière étant donné sa division en de nombreuses sous-régions ayant des interactions complexes entre elles et avec les autres aires corticales [7, 84, 134].

En somme, en se fiant aux travaux concernant la connectivité dans le cerveau de souris, on pourrait s'attendre à voir apparaître un groupe sensorimoteur formé de la région somatosensorielle et de la région motrice, qui aurait une connectivité forte au sein du groupe et plus faible

avec les autres régions. On pourrait aussi voir apparaître un groupe formé des autres régions (associatif, visuel, rétrosplénial), mais celui-ci n'est pas autant discuté dans la littérature que le groupe sensorimoteur. D'autres groupes fréquemment étudiés, comme le *default mode network* (DMN) [53, 127], contiennent des aires corticales qui ne nous sont pas accessibles avec la fenêtre corticale employée ici.

Chapitre 3

Résultats et discussion

Disposant des données traitées et co-enregistrées, nous sommes en mesure d’adresser les deux objectifs de ce projet : quantifier au moyen du couplage neurovasculaire l’interaction entre le système neuronal et le système vasculaire d’une part, et analyser la connectivité fonctionnelle du système neuronal et du système vasculaire d’autre part.

D’abord, une brève discussion des tests statistiques employés pour l’analyse des données est faite. Puisque les données proviennent de multiples souris ayant des âges différents et que nous souhaitons comparer une multitude de facteurs, il est nécessaire de choisir les tests statistiques appropriés selon la situation.

Le premier objectif, quantifier l’interaction entre le système neuronal et le système vasculaire, est discuté à partir de la notion de couplage neurovasculaire. Celui-ci, exposé en détail à la section 2.1, mesure la corrélation entre le signal neuronal et le signal vasculaire, et donc mesure directement la manière dont les deux systèmes sont reliés. La façon dont le couplage neurovasculaire dépend de plusieurs paramètres est aussi discutée. Les résultats révèlent entre autres que le couplage vasculaire varie significativement entre les régions et selon l’état de la souris, mais que l’âge n’a pas d’impact significatif malgré les effets connus du vieillissement sur le système neurovasculaire.

Ensuite, le deuxième objectif, analyser la connectivité fonctionnelle du système neuronal et du système vasculaire, est discuté. Le concept de connectivité fonctionnelle nous permet de calculer la manière dont chaque région du cortex est connectée aux autres, puis de considérer l’influence des paramètres mentionnés ci-haut. Les notions de connectivité moyenne, de connectivité interne et externe, et de connectivité fonctionnelle dynamique sont aussi employées afin d’obtenir un portrait de l’organisation des systèmes corticaux et de mettre en évidence les similarités et les différences entre eux. Plusieurs résultats ressortent de cette analyse, dont la présence de communautés au sein des deux systèmes, une dépendance forte sur la région corticale qui s’exprime de manière différente dans le système neuronal que dans le système vasculaire, ainsi que des différences significatives lorsque l’état de la souris est considéré.

Nous terminons le chapitre avec une brève discussion de quelques facteurs limitants la portée de notre analyse : les imperfections dans les signaux mesurés, le co-enregistrement cortical approximatif ainsi que le modèle statistique employé.

Comme mentionné en avant-propos, des outils d’IA générative ont parfois été utilisés. Leur utilisation dans ce chapitre se limite à la création de scripts de visualisation de données afin de produire des figures, des suggestions de fonctions appropriées pour effectuer des calculs ou optimiser le code existant, ainsi que des suggestions sur les tests statistiques appropriés à utiliser en fonction de la structure des données. Les suggestions et le code fourni ont été systématiquement contre-vérifiés. Pour davantage de détails, consulter l’avant-propos.

3.1 Tests statistiques

Les données proviennent de plusieurs souris entre 6 et 16 mois réparties de la manière suivante :

- **Souris transgéniques (GCaMP)** : 13 (5M, 8F)
 - 11x 6 mois, 7x 8 mois, 7x 10 mois, 6x 12 mois, 4x 14 mois, 1x 16 mois
- **Souris *wildtype*** : 8 (4M, 4F)
 - 2x 6 mois, 1x 8 mois, 1x 10 mois, 6x 12 mois, 1x 14 mois, 1x 16 mois

Pour un total de 36 jeux de données provenant de souris GCaMP et 12 jeux de données provenant de souris *wildtype* (voir l’annexe D pour davantage de détails). En raison des différentes analyses effectuées, les groupes comparés peuvent être hétérogènes : il s’agit parfois de comparaisons au sein d’un même groupe (données paires, intra-individus), entre groupes (inter-individus), ou même des comparaisons de plusieurs facteurs simultanément. Autant que possible, des tests non paramétriques sont utilisés afin de ne pas poser d’hypothèse sur les distributions, mais des analyses de variance (ANOVA) paramétriques doivent parfois être utilisées.

Lorsqu’il s’agit de comparer deux groupes de données, on retrouve deux cas de figure principaux :

1. Les deux groupes sont indépendants et proviennent d’individus ou de séances d’imagerie différentes.

Exemples : comparaison des souris transgéniques et des souris *wildtype* (figures 3.1 et 3.7), comparaison des jeunes souris et des vieilles souris (figures 3.4 et 3.10). Analyses **inter-individus** ;

2. Les deux groupes proviennent des mêmes individus et des mêmes séances d’imagerie.

Exemples : comparaison de segments de basse et de haute amplitude (figures 3.3 et 3.11), comparaison de connectivité interne et externe (figure 3.8). Analyses **intra-individus**.

Des tests statistiques différents doivent être utilisés dans l'un et dans l'autre des cas puisque la structure des données est différente. Dans le premier cas, un test U de Mann-Whitney [83] peut être utilisé étant donné que les deux groupes sont indépendants l'un de l'autre. Dans le deuxième cas, un test des rangs signés de Wilcoxon [128] est utilisé car les données sont paires, c'est-à-dire qu'une mesure tirée du premier groupe aura toujours un analogue dans le second groupe provenant de la même souris et de la même séance d'imagerie (par exemple une comparaison de la connectivité interne avec la connectivité externe pour toutes les souris transgéniques).

Dans quelques cas, des comparaisons doivent être effectuées entre plusieurs groupes ou facteurs, plutôt que sur une seule paire ou sur un seul facteur. Trois cas nous demandent d'effectuer des tests statistiques plus complexes :

1. Lorsqu'on souhaite comparer une mesure dans les six régions entre elles (figures 3.2 et 3.8). Dans ce cas, une ANOVA de Friedman [49] est d'abord effectuée globalement sur toutes les régions à la fois pour déterminer si la région représente un facteur significatif. Ensuite, chaque paire de régions ($\binom{6}{2} = 15$ combinaisons des six régions) est testée individuellement avec un test des rangs signés de Wilcoxon (données paires), puis la valeur p est corrigée avec la méthode de Holm afin de corriger pour les comparaisons multiples [60].
2. Lorsqu'on souhaite comparer des paires de mesures, mais aussi quantifier l'effet du groupe d'âge (figure 3.10). Dans ce cas, l'ANOVA de Friedman ne peut pas être utilisée car les données ne sont pas paires et chaque groupe d'âge peut contenir un nombre différent d'individus. De plus, dans de tels cas on considère un mélange de facteurs intra-sujets (connectivité interne vs externe, système neuronal vs vasculaire) et inter-sujets (groupe d'âge). On utilise alors une ANOVA à effets mixtes [47], puis chaque paire de groupes est testée avec un test U de Mann-Whitney ou des rangs signés de Wilcoxon selon la structure des données. Finalement, une correction selon la méthode de Holm est appliquée.
3. Lorsqu'on souhaite comparer plusieurs facteurs inter-individus (connectivité interne vs externe, régions, système vasculaire vs système neuronal) (figure 3.8). Dans ce cas une ANOVA à deux facteurs (*two-way*) [48] est employée sur toutes les combinaisons de paramètres inter-individus étudiés. Les paires sont ensuite testées avec un test U de Mann-Whitney ou des rangs signés de Wilcoxon selon la structure des données, puis corrigées avec la méthode de Holm.

Peu importe le cas, les tests statistiques employés lors de l'analyse sont précisés en légende des figures.

3.1.1 Limitations des tests statistiques

Afin de pouvoir garder l'analyse statistique simple, nous avons fait une approximation importante : chaque jeu de donnée provenant d'une souris est considéré comme étant indépendant

des autres jeux de données, même s’il s’agit de la même souris à différents âges (par exemple, une séance d’imagerie de la souris M1 à 6 mois est considérée comme indépendante de la séance d’imagerie de M1 à 8 mois). Chaque souris ayant été imagée un nombre variable de fois, ceci fait en sorte que certaines puissent avoir un poids statistiques plus important par rapport aux autres.

Pour considérer adéquatement cet aspect dans notre analyse, il aurait été idéal d’utiliser un modèle statistique qui est en mesure de considérer ces facteurs supplémentaires et de traiter l’identité de chaque souris comme un paramètre parmi d’autres. Par exemple, un modèle linéaire à effets mixtes [86] permettrait de considérer le sujet (souris), l’âge, la région, le tissu (neuronale vs vasculaire), la connectivité (interne vs externe) et d’autres paramètres comme étant tous des facteurs différents, qu’ils soient inter- ou intra-individus. Cela aurait aussi évité de devoir employer un test statistique différent à chaque étape, mais aurait grandement complexifié la mise en place des tests statistiques. La complexité de ce modèle statistique est la raison pour laquelle il a été écarté pour les analyses qui suivent.

De plus, les interactions d’ordres supérieurs (par exemple entre la région, le tissu et la connectivité interne-externe, ce qui requerrait une ANOVA à trois facteurs au minimum, ou alors un modèle linéaire à effets mixtes) sont ignorés lors de cette analyse ; seulement les interactions entre deux facteurs sont considérées là où applicable.

3.2 Couplage neurovasculaire

Le calcul du couplage neurovasculaire est fait pour chaque souris tel qu’exposé à la section 2.1. Il est calculé pour chaque pixel individuellement en permettant un décalage entre les signaux d’au maximum deux secondes (dans une direction ou l’autre), puis moyenné sur chaque région corticale ou sur le cortex entier selon le test.

La première étape est de comparer le couplage neurovasculaire chez les souris transgéniques contre celui du groupe contrôle constitué des souris *wildtype*. Comme mentionné à la section 1.1.2, le signal neuronal mesuré chez les souris *wildtype* devrait théoriquement correspondre à du bruit, mais en réalité il se produit une contamination par le signal hémodynamique et par les pics de mouvement. Pour que l’analyse basée sur le signal de fluorescence soit robuste et représente un phénomène réel qui n’est pas essentiellement mené par du bruit, nous devons nous assurer que le groupe transgénique montre un couplage neurovasculaire significativement différent de celui du groupe *wildtype*. Le couplage neurovasculaire des souris transgéniques et celui des souris *wildtype* est montré à la figure 3.1.

Il existe une différence significative entre le couplage neurovasculaire chez les souris transgéniques (moyenne : $r = 0,32$) et celui chez les souris *wildtype* (moyenne : $r = 0,17$) ($p < 0,001$), ce qui valide qu’il existe une différence intrinsèque entre le signal neuronal des deux groupes.

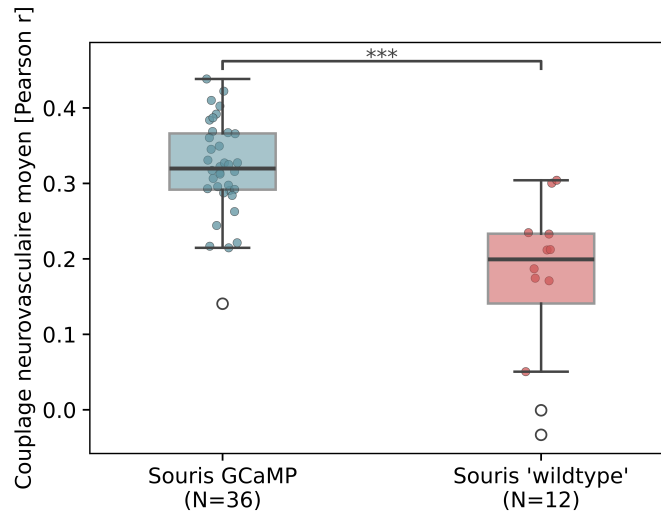


FIGURE 3.1 – Comparaison du couplage neurovasculaire (moyenne sur le cortex) des souris transgéniques (GCaMP) et *wildtype* (test U de Mann-Whitney, $p < 0,001$).

En contrepartie, le couplage neurovasculaire moyen des souris *wildtype* est de $r = 0,17$ plutôt que d'être nul. Bien qu'il soit plus bas que le résultat obtenu chez les souris transgéniques, chez des souris où on aurait réellement observé du bruit au lieu du signal neuronal cette valeur aurait dû être proche de zéro, ce qui indique que certains facteurs (notamment ceux discutés à la section 1.3) affectent le signal neuronal. Il est donc important pour la suite des analyses de garder en tête cette imperfection des données neuronales.

L'une des hypothèses discutées à la section 2.1.1 est que le couplage possède une dépendance spatiale dans le cortex. Nous pouvons étudier cette hypothèse en observant la moyenne du couplage neurovasculaire pour chacune des six régions corticales considérées dans notre analyse (figure 3.2).

Le couplage neurovasculaire a effectivement une forte dépendance spatiale : sur les 15 combinaisons de régions, seulement trois d'entre elles ont des distributions qui ne sont pas significativement différentes. Les régions motrice secondaire et rétrospéniale ont un couplage neurovasculaire qui est visiblement plus bas que celui des autres régions. Nous verrons d'ailleurs à la section 3.3.1 que deux de ces groupes de régions ayant un couplage neurovasculaire similaire (moteur primaire et somatosensoriel, associatif et visuel) concordent avec les groupes observés dans les matrices de connectivité fonctionnelle des systèmes corticaux. Notons aussi que ces deux paires sont formées de régions adjacentes dans le cortex, ce qui pourrait expliquer en partie leur couplage neurovasculaire similaire.

Une hypothèse cruciale du couplage neurovasculaire qui justifie l'utilisation de l'IRMf BOLD pour mesurer l'activité neuronale est que la réponse hémodynamique dépend de l'activité

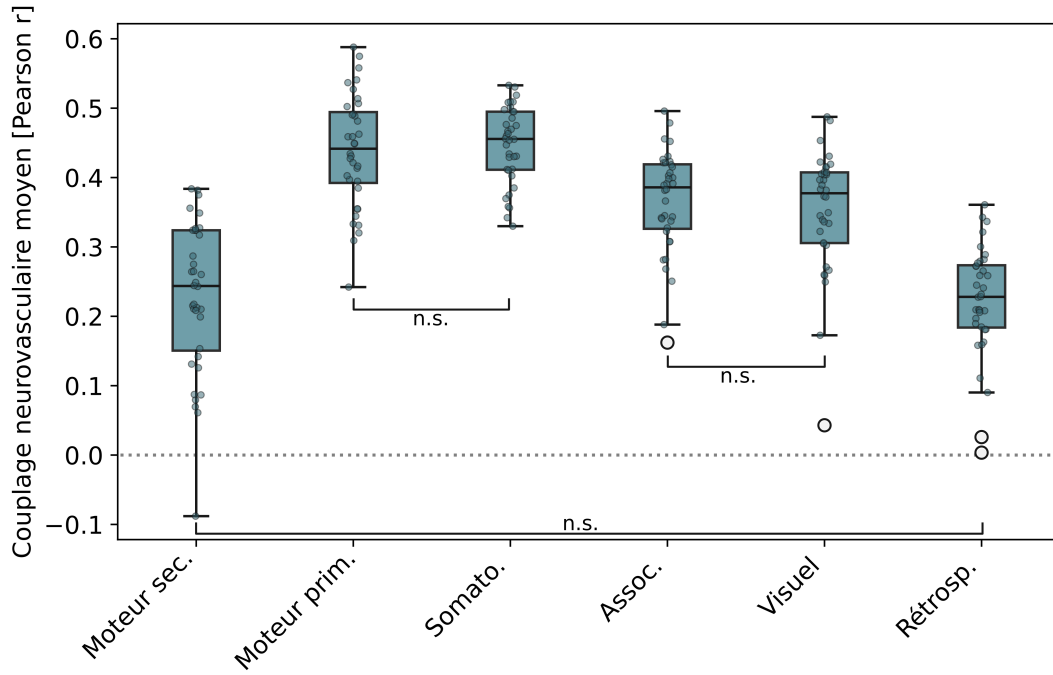


FIGURE 3.2 – Couplage neurovasculaire moyen par région. Une valeur p globale a été calculée avec une ANOVA de Friedman ($p < 0,001$), puis chaque paire a été testée par un test des rangs signés de Wilcoxon et une correction pour tests multiples selon la méthode de Holm. Hormis les trois paires non significatives indiquées sur la figure, toutes les paires sont significatives à $p < 0,001$.

neuronale. Lorsque le système neuronal s’active, le système vasculaire doit répondre afin de fournir les neurones en sang et en oxygène. Pour valider cette hypothèse, nous pouvons dans un premier temps observer si le couplage neurovasculaire dépend des co-fluctuations neuronales, et dans un second temps valider si un comportement similaire se produit en fonction de l’état de vigilance de la souris.

Ainsi, les séries temporelles neuronales et vasculaires sont divisées en deux segments selon la méthode décrite à la section 2.3. La segmentation est faite selon deux métriques différentes : la série temporelle de co-fluctuations (CTS) neuronale, et le diamètre de la pupille qui agit comme mesure de l’état de vigilance de la souris. Le premier cas décrit comment le couplage neurovasculaire varie durant les moments où plusieurs régions neuronales du cortex s’activent (ou se désactivent) simultanément. Le deuxième cas décrit comment le couplage neurovasculaire dépend de l’état de vigilance de la souris. Les résultats se trouvent à la figure 3.3.

Tel qu’attendu, le couplage neurovasculaire augmente durant les instants de hautes co-fluctuations neuronales (gauche de la figure 3.3). C’est aussi le cas durant les instants de haute vigilance (droite) mais la différence est plus faible. Ce résultat semble indiquer une réactivité accrue

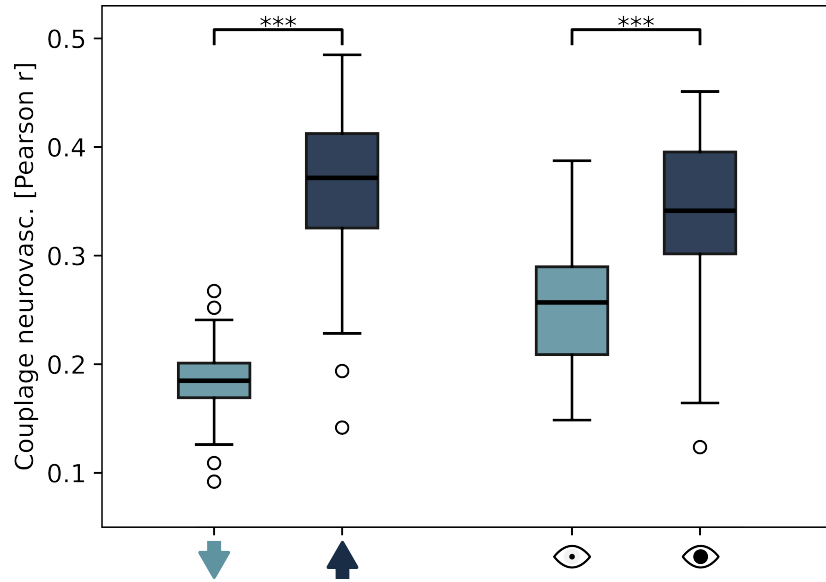


FIGURE 3.3 – Couplage neurovasculaire pendant les segments de basse et de haute amplitude. **Flèche pointant vers le bas** : segment de basses co-fluctuations neuronales. **Flèche pointant vers le haut** : segment de hautes co-fluctuations neuronales. **Œil avec la petite pupille** : segment de faible diamètre de pupille (état de vigilance bas). **Œil avec la grande pupille** : segment de diamètre de pupille élevé (état de vigilance élevé). Les deux paires sont significatives à $p < 0,001$ avec un test des rangs signés de Wilcoxon.

du système vasculaire lorsque l'état de vigilance de la souris est élevé, mais il s'agit d'un prédicteur plus faible que de simplement considérer l'activité neuronale. Ces résultats divergent des résultats préliminaires obtenus par [97], qui observent « des instances de cohérence hémodynamique réduite entre les régions corticales durant l'état de vigilance élevé » (traduit de l'anglais).

Finalement, il est pertinent d'analyser comment le couplage neurovasculaire évolue avec le vieillissement. Comme discuté à la section 2.1.1, la littérature montre que le vieillissement semble avoir peu d'effet sur le couplage neurovasculaire. Toutefois, il est connu que la réactivité cérébrovasculaire, c'est-à-dire la capacité des vaisseaux sanguins à se dilater et se contracter pour accommoder le changement de flot et de volume sanguin, diminue avec l'âge [93]. On peut en quelque sorte quantifier cette capacité d'adaptation des vaisseaux sanguins en calculant la différence de couplage neurovasculaire entre le segment de haute amplitude (co-fluctuations neuronales ou état de vigilance) et celui de basse amplitude ; une grande différence signifierait alors que les vaisseaux sanguins sont en mesure de s'adapter adéquatement. Il serait donc une hypothèse raisonnable que le couplage neurovasculaire augmente davantage entre le segment de basse et de haute activité chez les jeunes souris que chez les vieilles souris (figure 3.4).

Pour ce faire, les souris sont divisées en deux groupes : les jeunes souris qui ont 6, 8 et 10 mois (25 jeux de données), et les souris âgées qui ont 12, 14 et 16 mois (11 jeux de

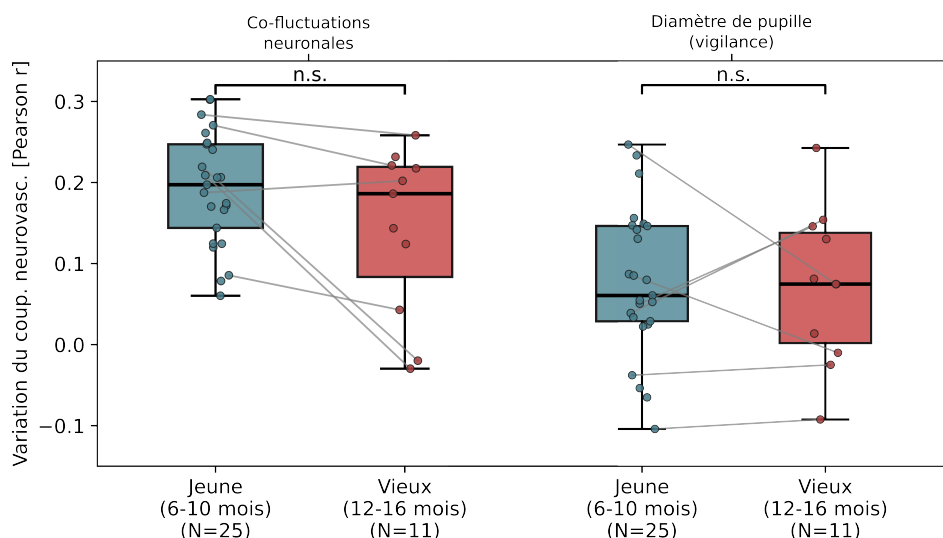


FIGURE 3.4 – Variation du couplage neurovasculaire entre le segment de basse amplitude et le segment de haute amplitude.

Gauche : les deux segments sont séparés par les co-fluctuations neuronales.

Droite : les deux segments sont séparés par diamètre de la pupille (état de vigilance).

Un test U de Mann-Whitney a été fait sur chaque paire. Les lignes grises représentent les souris qui ont au moins un jeu de données se retrouvant dans chacun des groupes (jeune et vieux).

données). Malgré le fait qu'on puisse observer un léger décalage négatif des distributions lorsqu'on considère les souris âgées, la différence n'est pas significative, et ce, autant pour les co-fluctuations neuronales (gauche de la figure 3.4) que pour l'état de vigilance (droite). Lorsqu'on observe les co-fluctuations neuronales, on constate que toutes les souris qui se retrouvent dans les deux groupes ont une tendance négative sauf une seule; cette tendance ne se retrouve toutefois pas dans la comparaison selon l'état de vigilance. Lorsqu'on compare simplement le couplage neurovasculaire moyen entre les jeunes souris et les souris âgées, la différence n'est pas significative non plus.

Au moment de faire l'analyse des données, des souris allant seulement jusqu'à 16 mois sont disponibles alors que le protocole de recherche prévoit l'imagerie jusqu'à 20 mois. De plus, nous disposons d'un nombre beaucoup plus faible de jeux de données provenant de souris âgées ($N = 11$) que de jeunes souris ($N = 25$). Une telle analyse devrait être revisitée avec un plus grand nombre de vieilles souris ainsi que des âges plus élevés afin de voir si on observe une tendance négative dans le couplage neurovasculaire au cours du vieillissement. Nos résultats actuels rejoignent ceux qui montrent que le vieillissement a une influence limitée sur le couplage neurovasculaire malgré tous les effets qu'il a sur le système neurovasculaire en général.

Bien sûr, la simple corrélation entre les deux signaux ne révèle pas le portrait complet. Plusieurs autres métriques pourraient être étudiées plus en détail, par exemple le délai et l'amplitude de

la réponse hémodynamique. Des analyses préliminaires du délai de réponse du couplage neurovasculaire n'ont cependant pas révélé de différences significatives au cours du vieillissement, à l'instar du couplage neurovasculaire lui-même.

En résumé, on constate que le couplage neurovasculaire possède des dépendances significatives sur la région corticale étudiée et qu'il varie dynamiquement selon les co-fluctuations neuronales et l'état de vigilance de la souris. Nos résultats ne montrent pas de dépendance du couplage neurovasculaire sur le groupe d'âge considéré. Ces résultats montrent la nécessité de considérer les dépendances spatiales et dynamiques du couplage neurovasculaire afin de modéliser adéquatement les fonctions de réponse hémodynamique, particulièrement dans des contextes où la mesure d'un système dépend de l'autre comme en IRMf BOLD.

3.3 Connectivité fonctionnelle

La matrice de connectivité fonctionnelle est calculée individuellement pour chaque souris. Un exemple de connectivité fonctionnelle se trouve à la figure 3.5.

Dans la colonne de gauche se trouvent les matrices de connectivité fonctionnelle complète, c'est-à-dire avant de faire le moyennage de chaque région; la FC se trouve donc sur une échelle de -1 à 1 puisqu'il s'agit d'un coefficient de corrélation. Un partitionnement par la méthode de Louvain adaptée aux matrices signées et non dirigées [101] a été effectué pour mettre en évidence des blocs de connectivité.

Appliquer un partitionnement sur ces matrices fait apparaître des blocs au sein de quelques régions. Par exemple, ils sont particulièrement visibles dans la région motrice secondaire neuronale, ou dans la région rétropléniale vasculaire. Ces blocs suggèrent qu'il existe potentiellement un niveau de subdivision ou d'organisation supplémentaire au sein de certaines régions corticales considérées. Il pourrait notamment s'agir de la division gauche-droite, étant donné que les deux hémisphères ont été combinés pour l'analyse, ou il pourrait s'agir d'une subdivision fonctionnelle de la région. Par exemple, dans le cas de la région rétropléniale, les deux blocs pourraient correspondre à certaines des subdivisions régionales montrées à la figure 1.8 qui ont été combinées dans notre analyse. Bien que ce partitionnement puisse varier entre les individus, le fait qu'il existe des subdivisions qui soient visibles dans un système (neural, vasculaire) mais pas dans l'autre montre des différences entre l'organisation de ces deux systèmes.

Dans la colonne de droite, on retrouve les matrices de connectivité moyenne, où chaque élément est obtenu en faisant la moyenne de tous les éléments dans une paire de régions, dans la matrice complète de gauche. Il s'agit à la figure 3.5 d'un exemple pour une seule souris, mais une version où toutes les souris ont été moyennées ensemble se trouve à la figure 3.6.

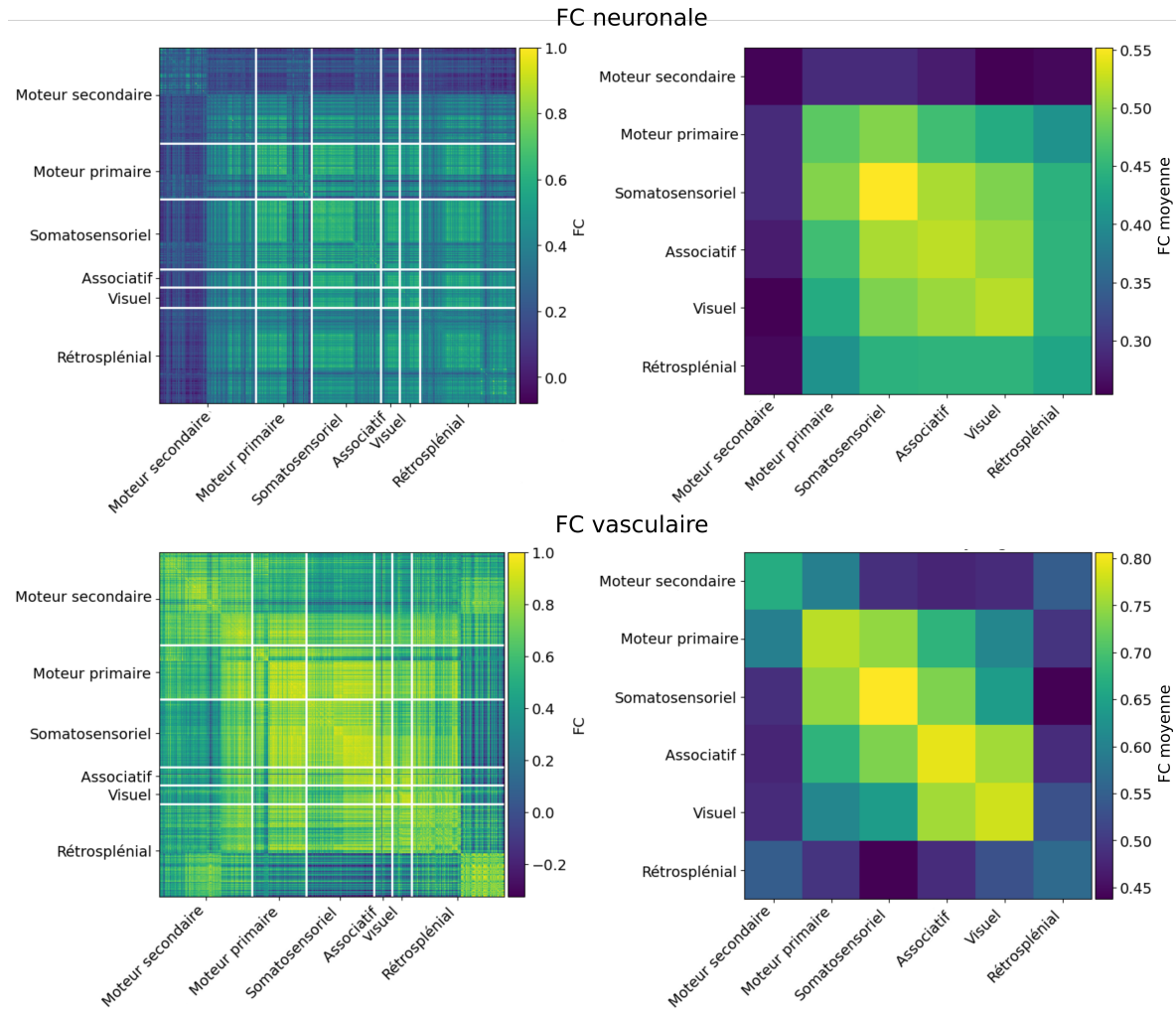


FIGURE 3.5 – Exemple de connectivité fonctionnelle et de connectivité fonctionnelle moyenne pour la souris M396 à 6 mois.

Gauche : connectivité fonctionnelle complète, partitionnée au sein de chaque région.

Droite : connectivité fonctionnelle moyenne, obtenue en moyennant au sein de chaque région de la matrice à gauche (délimitations blanches).

Haut : connectivité neuronale.

Bas : connectivité vasculaire.

3.3.1 Connectivité moyenne

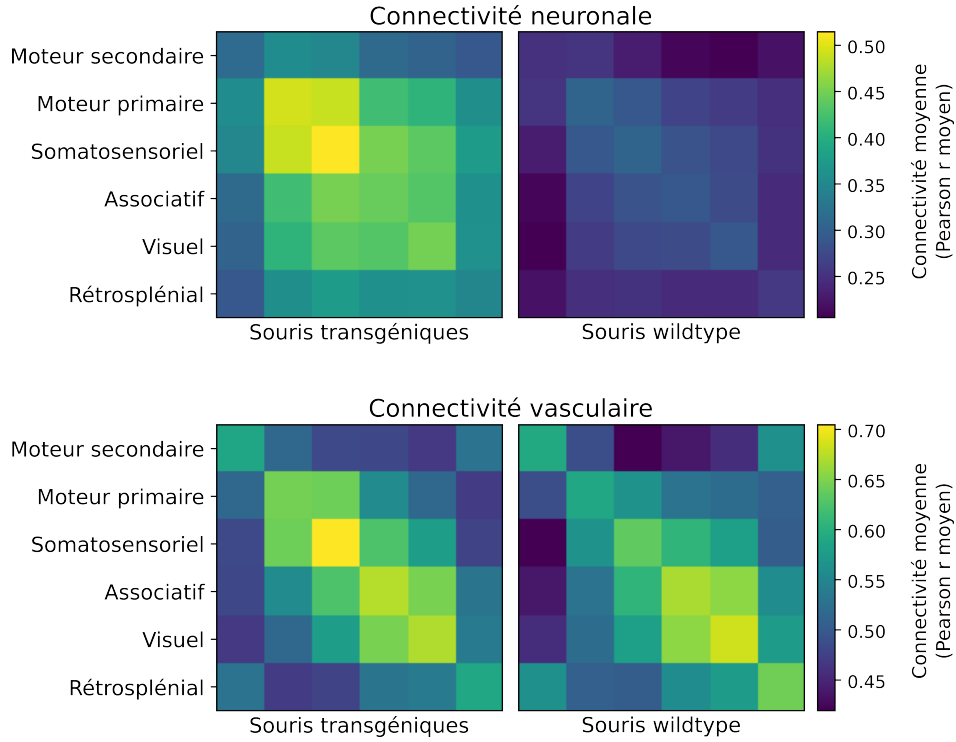


FIGURE 3.6 – Connectivité moyenne de chaque région corticale, moyennée sur toutes les souris transgéniques (gauche) et *wildtype* (droite). La rangée du haut représente la connectivité obtenue à partir du signal neuronal (GCaMP) et la rangée du bas la connectivité obtenue à partir du signal vasculaire (hémoglobine totale).

La figure 3.6 contient un aperçu de la connectivité moyenne pour chaque paire de régions. Pour obtenir cette figure, les matrices de connectivité moyenne de chaque souris ont été moyennées ensemble afin d'obtenir une seule matrice agissant comme un portrait de la connectivité moyenne pour toutes les souris. Le simple fait qu'il en ressorte des patrons de connectivité clairs montre qu'il existe une structure de base commune à la majorité des réseaux neuronaux et vasculaires ; si leur organisation était aléatoire, on observerait des matrices plus ou moins uniformes en les moyennant ensemble.

Connectivité moyenne neuronale

La première rangée de la figure 3.6 correspond à la connectivité moyenne neuronale. La matrice de gauche représente les souris transgéniques (qui expriment le marqueur calcique GCaMP) et la matrice de droite représente les souris *wildtype* (qui ne l'expriment pas). Comme mentionné aux précédentes sections, ce second groupe est en quelque sorte le contrôle : étant donné qu'il n'y a aucun marqueur calcique, on devrait uniquement mesurer du bruit pour le signal neuronal de la fenêtre corticale, et en conséquence la connectivité devrait être approximativement nulle.

Cependant, comme détaillé à la section 1.3, certains artefacts peuvent faire en sorte qu'on observe un signal qui présente des corrélations non nulles plutôt que seulement du bruit.

Pour la matrice de connectivité moyenne des souris transgéniques, on observe une connectivité par blocs. D'abord, il existe un grand bloc de connectivité plus élevée constitué des régions motrice primaire, somatosensorielle, associative et visuelle. Ensuite, au sein de ce bloc principal, un second bloc de connectivité très élevée constituée de la région motrice primaire et de la région somatosensorielle. Notons que les quatre régions contenues dans ce bloc de connectivité élevée correspondent aux quatre régions pour lesquelles le couplage neurovasculaire était plus élevé (section 3.2). On remarque que la région motrice secondaire est celle qui est la plus faiblement liée aux autres régions corticales, bien qu'on aurait pu croire qu'elle soit hautement corrélée à la région motrice primaire.

Comment expliquer ce découplage entre le cortex moteur secondaire et le reste du cortex, et cette corrélation élevée entre le cortex moteur primaire et l'aire somatosensorielle? Il est possible que cela soit directement lié aux conditions d'imagerie à l'état de repos (*resting state*). Pendant celle-ci, la tête de la souris est fixée solidement de manière que la majorité des mouvements ne soient pas possibles; dans ce contexte, les seuls mouvements qui surviennent sont des mouvements courts et simples plutôt que des comportements plus complexes, et on constate souvent un mouvement simultané des vibrisses, dont la rétraction est liée à l'activité de l'aire somatosensorielle [85, 113].

Le cortex moteur primaire est connu pour être fortement lié à l'exécution des mouvements volontaires [104] (incluant les mouvements orofaciaux [120]) tandis que le cortex moteur secondaire est relié à des fonctions plus complexes comme l'intégration du contexte, des stimuli et du comportement dans les tâches motrices [5, 85, 103, 122]. Il est donc plausible que l'aire motrice primaire et l'aire somatosensorielle soient davantage sollicitées étant donné les mouvements simples effectués par la souris, et que l'intervention du cortex moteur secondaire soit moins nécessaire puisqu'il n'y a pas de stimuli ni de contexte comportemental à traiter, et pas de tâche particulière à effectuer. Il est aussi intéressant de remarquer que la région motrice secondaire possède une connectivité interne qui est plus faible que bon nombre de ses connexions externes vers les autres régions, particulièrement vers les régions motrice primaire et somatosensorielle.

Pour la matrice de connectivité moyenne des souris *wildtype*, on observe un patron de connectivité similaire à celui des souris transgéniques, mais d'amplitude plus faible. Ceci peut être expliqué par le fait que le signal neuronal qui est observé dans les souris *wildtype* provient essentiellement de pics de mouvement et de contamination hémodynamique. Les pics de mouvement, qui sont généralement simultanés dans toutes les régions, peuvent faire en sorte d'augmenter artificiellement les corrélations entre toutes les régions. La contamination hémodynamique, qui est reliée à l'absorbance de la lumière par le sang, peut induire un patron de connectivité

qui est similaire à celui de la connectivité vasculaire. Toutefois, comme on le constate à la figure 3.7, la différence de connectivité moyenne entre les souris transgéniques et *wildtype* est tout de même significative, ce qui valide l'approche utilisée.

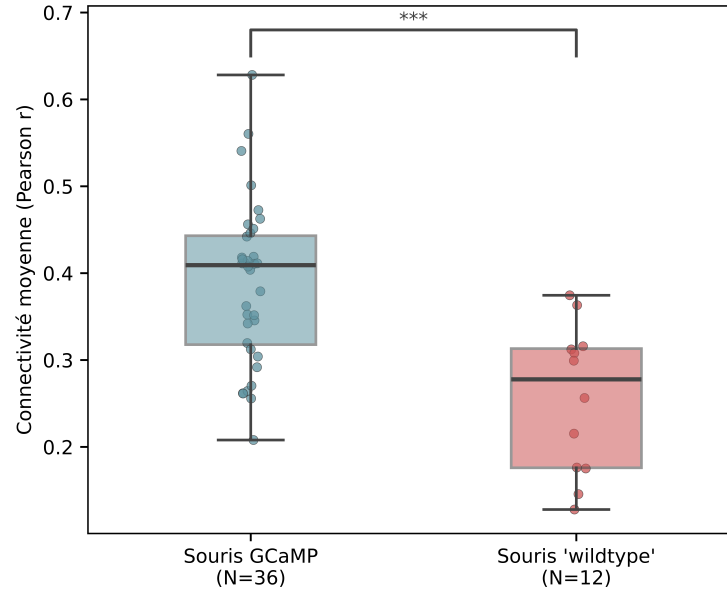


FIGURE 3.7 – Comparaison de la connectivité moyenne globale, obtenue en moyennant toutes les paires de régions, des souris transgéniques et *wildtype* (test U de Mann-Whitney, $p = 0,00034$).

Connectivité moyenne vasculaire

La seconde rangée de la figure 3.6 représente quant à elle la connectivité vasculaire. Celle-ci, au contraire de la connectivité neuronale, ne devrait pas différer entre les souris transgéniques et les souris *wildtype* : l'imagerie vasculaire ne dépend pas d'un marqueur génétique, mais plutôt de propriétés physiologiques qui sont observées peu importe si la souris est transgénique ou pas. On observe bel et bien que les deux matrices sont très similaires ; en faisant un test U de Mann-Whitney pour comparer les distributions des deux groupes (de façon analogue à la figure 3.7, mais pour la connectivité vasculaire plutôt que neuronale), on obtient $p = 0.97$, ce qui montre que tel qu'attendu les distributions ne sont pas significativement différentes au niveau vasculaire.

La structure de la matrice de connectivité vasculaire est toutefois différente de celle de la matrice de connectivité neuronale. En premier lieu, on remarque que la diagonale (connectivité interne) est toujours plus élevée que les éléments hors diagonale (connectivité externe). Ceci est bien visible par exemple pour la région motrice secondaire, qui dans le cas neuronal a une connectivité interne plus faible que sa connectivité externe avec les régions avoisinantes, alors que dans le cas vasculaire sa connectivité interne est supérieure.

On remarque aussi au niveau vasculaire une structure en blocs qui s'apparente à la structure neuronale, avec l'addition cette fois d'un bloc de plus grande connectivité entre la région visuelle et la région rétropléniale. Ceci donne lieu à une sorte de structure hiérarchique, où il y a un grand bloc (moteur primaire, somatosensoriel, associatif, visuel), qui se sépare en deux plus petits blocs (moteur primaire et somatosensoriel, associatif et visuel). De manière générale, les éléments autour de la diagonale dans la connectivité vasculaire sont plus élevés alors que dans le cas neuronal on observe des blocs plus uniformes.

Ceci peut être expliqué par la structure en arbre des vaisseaux sanguins : les artères, d'abord larges, se divisent successivement en plus petits arbres vasculaires qui apportent le sang aux régions corticales jusqu'à parvenir à la taille des capillaires [131]. Intrinsèquement, le système vasculaire possède donc une structure hiérarchique où on doit remonter le long de chaque embranchement pour retrouver un vaisseau commun avec d'autres régions ; plus la région est éloignée, plus on doit remonter pour trouver un vaisseau sanguin commun avec elle. Ceci est fort différent de la connectivité des neurones, qui eux forment des communautés fonctionnelles de grande densité de connexion, reliées entre elles par des connexions à longue portée [92, 102].

Étant donné que les deux paires de régions qui forment des blocs (moteur primaire et somatosensoriel, associatif et visuel) sont constituées de régions adjacentes dans le cortex, il est possible qu'elles soient approvisionnées en sang par une artère commune qui se divise pour desservir chaque région individuellement. Ce phénomène expliquerait aussi pourquoi les éléments diagonaux, représentant une région qui pourrait être desservie par une subdivision distincte de l'arbre vasculaire, sont toujours plus grands que les éléments hors diagonale.

À partir de la matrice de connectivité moyenne de chaque souris, on peut obtenir pour chaque région une valeur de connectivité interne en considérant la valeur sur la diagonale, et une valeur de connectivité externe en considérant la moyenne des valeurs hors diagonale. Le calcul de la connectivité interne et externe est expliqué plus en détail à la section 2.2.1 et à la figure 2.6. Un aperçu des connectivités internes et externes compilées pour le système neuronal et vasculaire ainsi que pour toutes les régions se trouve à la figure 3.8.

Différence entre la connectivité interne et externe

Chaque boîte à moustache de la figure 3.8 contient les mêmes souris aux mêmes âges, de sorte qu'elles sont pairées entre elles. Au niveau neuronal, toutes les différences entre la connectivité interne et externe sont significatives à $p < 0,001$ hormis pour la région motrice secondaire ($p < 0,05$) et la région rétropléniale (non significatif). Au niveau vasculaire, toutes les différences sont significatives ($p < 0,001$).

Ces résultats concordent globalement avec ce qui est attendu dans la littérature pour le système neuronal ; on peut généralement s'attendre à observer des groupes de neurones fortement connectés entre eux, qui sont connectés aux autres groupes par le biais de connexions à longue

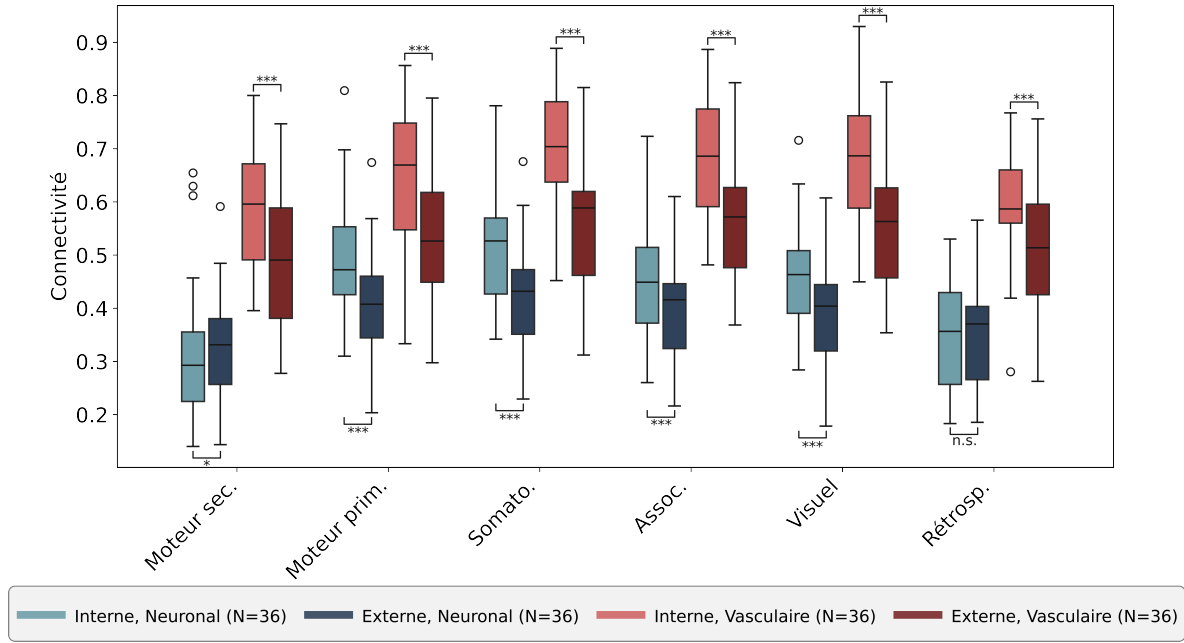


FIGURE 3.8 – Connectivité interne et externe pour toutes les régions. La connectivité neuronale est en bleu et la connectivité vasculaire en rouge. Les valeurs p sont calculées avec un test des rangs signés de Wilcoxon et indiquées directement (* : $p < 0,05$, *** : $p < 0,001$, n.s. : non significatif).

portée [92, 102], et c'est ce qu'on observe pour la majorité des régions excluant l'aire rétropléniale et l'aire motrice secondaire. Cette dernière présente en fait le comportement inverse : sa connectivité externe est plus élevée que sa connectivité interne.

Différence entre les régions

Globalement, il y a une différence significative entre la connectivité interne et externe de chaque région. Mais qu'en est-il de la différence entre les régions ? Est-ce que l'écart interne-externe varie de façon importante entre les régions, ou autrement dit est-ce que certaines régions forment des modules plus ou moins connectés au reste du cortex que d'autres ? On peut ainsi comparer la différence entre la connectivité interne et la connectivité externe dans toutes les régions (figure 3.9).

Les deux systèmes offrent un portrait différent : sur les 15 paires de régions, 12 des comparaisons entre régions sont significativement différentes dans le cas neuronal, mais seulement quatre comparaisons le sont dans le cas vasculaire. On observe donc que la différence interne-externe possède une dépendance spatiale et régionale importante dans le cas neuronal ; chaque région est plus ou moins fortement liée au sein d'elle-même et a une proportion différente de liens à longue portée que les autres régions. Pour le système vasculaire, chaque région a une connectivité interne plus grande que la connectivité interne certes, mais ce phénomène

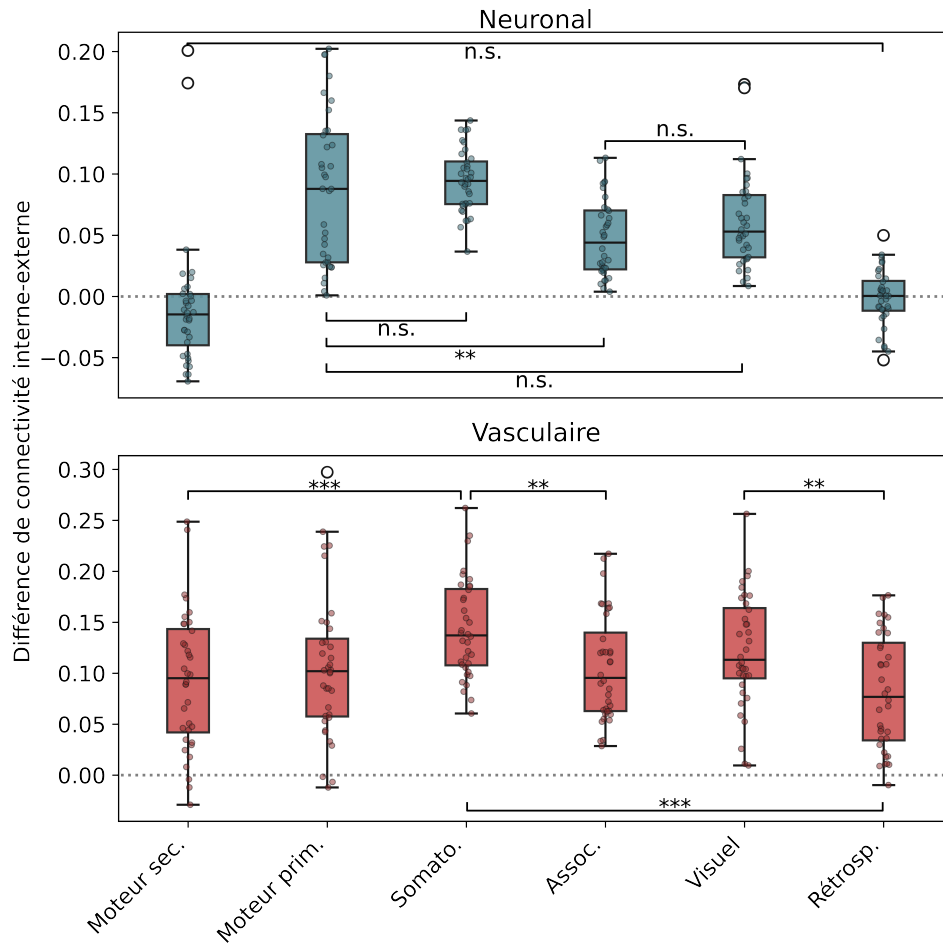


FIGURE 3.9 – Différence entre la connectivité interne et la connectivité externe pour chaque région, pour le système neuronal (haut) et le système vasculaire (bas). Une valeur p globale a été calculée avec une ANOVA de Friedman ($p < 0,001$ dans les deux cas), puis des valeurs p ont été calculées pour chaque paire avec un test des rangs signés de Wilcoxon et une correction pour tests multiples selon la méthode de Holm.

Neuronal : Toutes les différences sont significatives à $p < 0,001$ sauf celles indiquées sur le graphique (** : $p < 0,01$, n.s. : non significatif)

Vasculaire : Toutes les différences sont non significatives sauf celles indiquées sur le graphique (** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$).

demeure très similaire pour la majorité des régions. On constate donc que la structure du système vasculaire semble plus uniforme que celle du système neuronal.

Effet de l'âge sur la connectivité interne et externe

Jusqu'à maintenant, les jeux de données provenant de souris de tous âges ont été considérés ensemble lors des analyses de connectivité. On peut toutefois les séparer en groupes d'âges afin de déterminer si l'âge a un effet sur la connectivité. Les résultats se trouvent à la figure 3.10.

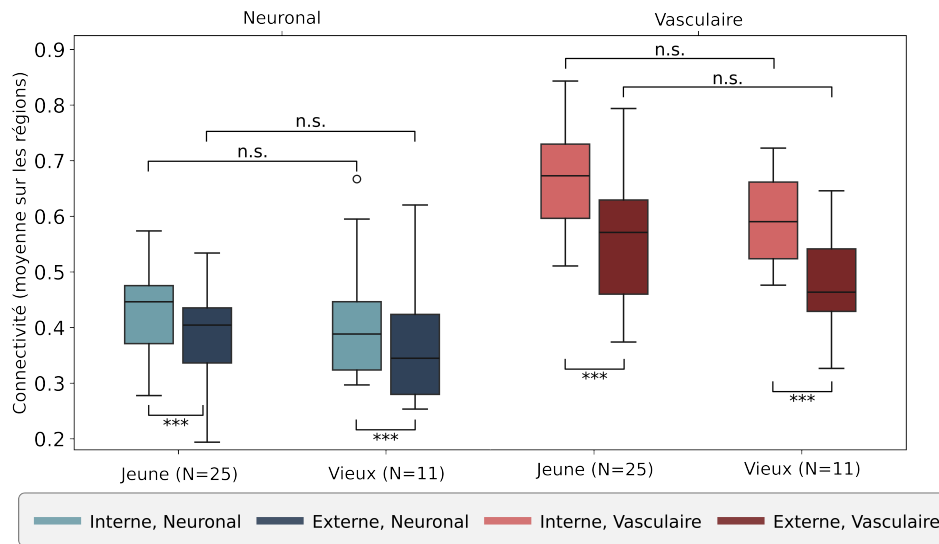


FIGURE 3.10 – Connectivité interne et externe selon le groupe d’âge de la souris. Une ANOVA globale à effets mixtes a été fait sur chacun des groupes (neuronal et vasculaire) avec comme paramètres le groupe d’âge (jeune ou vieux) et la connectivité (interne ou externe). Les paires interne-externe sont testées avec un test des rangs signés de Wilcoxon, et les paires jeune-vieux sont testées avec un test U de Mann-Whitney. Toutes les valeurs p obtenues sont corrigées avec la méthode de Holm.

Neuronal : Dans l’ANOVA globale, la différence entre la connectivité interne et externe est significative ($p < 0,001$), mais l’effet du groupe d’âge et l’interaction âge-connectivité ne le sont pas.

Vasculaire : Dans l’ANOVA globale, la différence entre la connectivité interne et externe est significative ($p < 0,001$), et la différence entre groupes d’âges l’est aussi ($p < 0,05$). L’interaction âge-connectivité n’est pas significative.

Chaque paire de connectivité interne-externe conserve une différence significative au cours du vieillissement, que ce soit pour le système neuronal ou le système vasculaire. Il est intéressant de noter que l’ANOVA réalisée révèle que le groupe d’âge a un effet significatif dans le cas du système vasculaire, mais pas dans le cas du système neuronal. Il est possible que les deux systèmes vieillissent de manière différente, et que le vieillissement du système vasculaire soit prématuré, ou alors plus facilement détectable avec une analyse de ce type. À l’inverse, il est aussi possible que le système neuronal vieillisse d’une manière qui soit plus difficilement perceptible simplement par le biais de la connectivité interne et externe. Toutefois, puisque les comparaisons par paires ne révèlent pas de différences significatives, davantage d’analyses seront nécessaires afin de mieux comprendre cette différence entre les deux systèmes au cours du vieillissement.

3.3.2 Connectivité fonctionnelle dynamique

Dans les sections précédentes, les séries temporelles entières ont été considérées lors du calcul de la connectivité fonctionnelle, c'est-à-dire que nous avons employé la définition usuelle de la connectivité fonctionnelle. Tout comme ce qui a été fait à la section 3.2 lors de l'analyse du couplage neurovasculaire, nous pouvons diviser les séries temporelles en fonction des co-fluctuations neuronales ou du diamètre de la pupille. On obtient ainsi deux matrices de connectivité fonctionnelle dynamique, dont l'une représente l'état de haute amplitude (co-fluctuations, état de vigilance) et l'autre représente l'état de faible amplitude. Les valeurs de connectivité interne et externe pour chaque segment se trouvent à la figure 3.11.

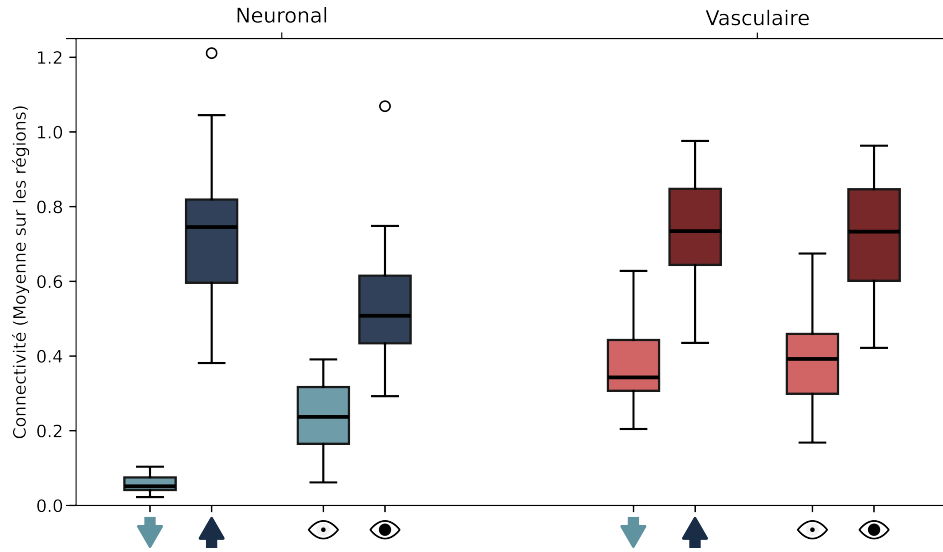


FIGURE 3.11 – Connectivité moyenne (sur toutes les régions) neuronale et vasculaire.
Flèche pointant vers le bas : segment de basses co-fluctuations neuronales.
Flèche pointant vers le haut : segment de hautes co-fluctuations neuronales.
Œil avec la petite pupille : segment de faible diamètre de pupille (état de vigilance bas).
Œil avec la grande pupille : segment de diamètre de pupille élevé (état de vigilance élevé).
 Les quatre paires sont significatives à $p < 0.001$ avec un test des rangs signés de Wilcoxon.

Il est attendu que la différence de connectivité neuronale soit aussi marquante dans le cas des co-fluctuations neuronales. Puisque c'est la CTS neuronale qui sert à séparer les segments et que la CTS est elle-même obtenue à partir des matrices de dFC, il est tout à fait normal que le segment de basse amplitude contienne les matrices de dFC faible connectivité et que le segment de haute amplitude contienne les matrices de haute connectivité, et en conséquence, il est attendu que la connectivité moyenne suive de très près les co-fluctuations neuronales. Il est cependant intéressant de constater que la connectivité neuronale séparée par état de vigilance suive une tendance similaire, même si la différence est plus petite.

La connectivité du système vasculaire varie elle aussi en fonction des co-fluctuations neuronales. Non seulement le système vasculaire réagit lors des fluctuations neuronales, comme

nous en avons discuté à la section 3.2 par rapport au couplage neurovasculaire, mais l'interaction entre les différentes régions vasculaires est aussi accrue durant ces instants. De plus, la différence de connectivité vasculaire entre les segments de co-fluctuations neuronales est très similaire à la différence de connectivité vasculaire entre les instants de basse et de haute vigilance. Comme exposé à la section 2.4.1, le chevauchement des segments de co-fluctuations neuronales et de vigilance est de moins de 60%, donc ce résultat très similaire n'est pas attribuable au fait que les mêmes instants sont considérés dans un cas et dans l'autre. Ceci suggère que plusieurs processus différents puissent augmenter la connectivité vasculaire de manière similaire.

En résumé, les systèmes neuronal et vasculaire présentent des différences majeures au niveau de leur connectivité respective. La connectivité neuronale présente des communautés qui sont corrélées à plus longue portée, tandis que la connectivité vasculaire présente une structure hiérarchique plus locale. Dans les deux systèmes, la connectivité interne est typiquement plus élevée que la connectivité externe, mais ce phénomène est plus uniforme entre les régions corticales dans le système vasculaire, tandis qu'il varie entre régions dans le système neuronal. Dans les groupes de souris étudiés, l'âge a un impact significatif dans la connectivité du système vasculaire, mais pas dans celle du système neuronal. Dans les deux systèmes, la connectivité augmente lorsqu'on considère les instants de hautes co-fluctuations neuronales ou de vigilance élevée, plutôt que lorsqu'on considère les segments de basse amplitude.

3.4 Facteurs limitants et avenues futures

Trois facteurs majeurs limitent la portée de nos analyses et de nos conclusions, et devraient être explorés ou rectifiés dans de futurs travaux.

Premièrement, la présence d'artefacts de mouvement et de contamination hémodynamique dans les données neuronales affectent négativement les données et limitent les analyses qui peuvent être faites. Comme montré aux figures 3.1 et 3.7, bien qu'il y ait des différences significatives entre les souris transgéniques et les souris *wildtype*, les résultats obtenus pour ces dernières ne concordent pas avec ce à quoi on pourrait s'attendre pour des souris n'exprimant pas GCaMP. Il est difficile de juger à quel point ces imperfections dans les données affectent le signal neuronal, et par extension le reste des analyses. Par exemple, au niveau de la connectivité fonctionnelle, des données neuronales affectées par la contamination hémodynamique pourraient révéler des patrons de connectivité entre régions qui s'écartent de la réalité, puisque nous avons montré que les systèmes neuronal et vasculaire présentent des différences sur cet aspect. Afin d'améliorer la qualité des données, des modèles de correction de la lumière émise et réfléchi ou se basant sur une source de lumière isobestique pourraient être utilisées, tel que décrit à la section 1.3.

Deuxièmement, une manière plus précise d'effectuer le co-enregistrement cortical devrait être

employée. Comme mentionné à la section 1.5, le recalage de l’atlas se fait de manière approximative en se basant sur la position typique de la fenêtre crânienne, la position typique de la fenêtre corticale et la taille moyenne d’un cerveau de souris. Le premier facteur permet un ajustement relativement précis de l’atlas sur l’axe latéral, mais les deux derniers facteurs sont sujets à des variations entre les individus et n’offrent pas de manière précise de recalibrer l’atlas sur l’axe longitudinal ni d’en fixer l’échelle. C’est pour ces raisons qu’un faible nombre de régions fonctionnelles ont été considérées ; plus le nombre de régions co-enregistrées à l’intérieur du même champ de vue est élevé, moins chacune des régions contient de pixels et plus les variations dans le co-enregistrement peuvent induire des proportions importantes d’erreurs dans les associations pixels-régions. Avoir un nombre plus élevé de régions permettrait notamment de résoudre certains des blocs fonctionnels obtenus en partitionnant les régions, par exemple au sein des régions motrice secondaire et rétrospléniale (figure 3.5) et d’avoir un portrait plus complet de la dépendance spatiale de la connectivité et du couplage neurovasculaire. Il s’agirait d’une étape particulièrement pertinente pour être en mesure d’étudier adéquatement les régions pourvues de nombreuses subdivisions avec des fonctions distinctes, comme l’aire visuelle. Avec des données provenant de souris effectuant une tâche ou soumises à des stimuli précis, il serait possible d’effectuer un co-enregistrement fonctionnel qui serait plus précis et rigoureux que le co-enregistrement approximatif actuel.

Finalement, un modèle statistique plus complet et plus approprié à la structure de nos données serait de mise. Tel que mentionné à la section 3.1, nous avons ignoré le fait que certaines souris avaient été imagées davantage de fois que d’autres. On peut justifier ce choix par le fait que chaque prise de données a été effectuée à un âge différent (intervalles de deux mois au minimum), ce qui leur confère une certaine indépendance, mais on peut difficilement ignorer le fait que cela accorde tout de même davantage de poids statistiques à certains individus. Pour remédier à ceci, il serait plus approprié d’utiliser une méthode comme un modèle linéaire à effets mixtes, qui permettrait de considérer chaque individu et son âge comme des paramètres statistiques au même titre que la région ou le type de connectivité (interne ou externe). Non seulement cela réglerait les problèmes de fiabilité des tests statistiques effectués, mais il serait alors possible de tester l’interaction entre tous les paramètres, en plus de tester les interactions d’ordres supérieurs (par exemple : tester si l’âge de la souris modifie la relation entre la connectivité interne et externe dans certaines régions moins que dans d’autres).

Conclusion

Les systèmes neuronal et vasculaire, tous deux centraux à l'étude du cerveau, montrent une grande richesse autant dans leurs interactions l'un avec l'autre que dans la connectivité propre à chacun. Bien que le couplage entre ces deux systèmes soit parfois tenu comme constant et simple dans plusieurs modèles couramment utilisés en recherche, dont l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle BOLD, les travaux faisant l'étude du système neurovasculaire mettent en lumière la complexité de ce système et sa dépendance sur plusieurs phénomènes et paramètres. Pour mieux comprendre ceux-ci, nous faisons appel à des méthodes d'imagerie optique permettant de résoudre le système neuronal et le système vasculaire séparément.

Dans ce contexte et disposant de données optiques provenant de souris à l'état de repos, ce projet poursuivait deux objectifs principaux. Le premier consistait à quantifier l'interaction entre le système neuronal et le système vasculaire par le couplage neurovasculaire, ainsi qu'à évaluer la dépendance de ce dernier sur des paramètres tels que la région corticale, l'âge de l'individu, et son état de vigilance ou d'activité neuronale. Le second objectif était de quantifier l'organisation des systèmes neuronal et vasculaire par le biais de la connectivité fonctionnelle, ainsi que d'analyser les variations de cette connectivité en fonction des mêmes facteurs.

Nous avons dans un premier temps utilisé des données neuronales et vasculaires mesurées séparément par imagerie optique pour calculer le couplage neurovasculaire. Ce dernier a été clairement défini, puis a été calculé pour toutes les souris indépendamment. Nos résultats révèlent que les six régions corticales étudiées (moteur primaire et secondaire, somatosensoriel primaire, associatif pariétal, visuel et rétrospécial) diffèrent significativement dans leur couplage neurovasculaire, et qu'il est plus élevé dans les instants où l'animal est en état de haute vigilance ou de hautes co-fluctuations neuronales. Aucune différence significative n'a été trouvée en comparant le couplage neurovasculaire de jeunes souris avec celui de souris âgées.

Dans un second temps, nous avons utilisé ces mêmes données afin de calculer la connectivité fonctionnelle du système neuronal et du système vasculaire de manière distincte. Autant pour l'un que pour l'autre, nos résultats montrent une différence significative entre la connectivité au sein d'une région et la connectivité entre différentes régions, mais montre aussi que le système vasculaire présente une organisation plus uniforme. Nos résultats ont aussi mis en évidence l'existence de communautés au sein de ces systèmes, qui ont des connexions à plus

longues portées dans le système neuronal et qui sont plus locales dans le système vasculaire. L'âge de l'individu est aussi un facteur significatif en ce qui concerne la connectivité, mais uniquement pour le système vasculaire. La connectivité des deux systèmes était aussi impactée significativement par l'état de vigilance et de co-fluctuations neuronales de l'animal.

Les résultats obtenus ici font toutefois face à quelques limitations qui restreignent la portée des conclusions. Notamment, la présence d'artefacts de mouvement et de contamination hémodynamique dans le signal neuronal fait en sorte qu'il soit difficile de s'assurer que les résultats observés au niveau du système neuronal ne sont pas teintés de l'influence du système vasculaire. Étant donné que la motivation primaire derrière l'étude optique du système cortical est de résoudre séparément le système neuronal du système vasculaire, il s'agit d'un problème qui doit être réglé avant de pousser plus loin les analyses. Il existe des méthodes de correction plus rigoureuses qui pourraient être mises en place, par exemple basées sur une correction à la fois de la lumière émise par le montage et de celle réfléchie par le cortex, ou encore à l'aide d'une source isobestique ajoutée au système d'imagerie.

De plus, le co-enregistrement cortical approximatif qui est effectué afin de relier les pixels imagés aux régions fonctionnelles est approprié pour un faible nombre de régions, mais doit être amélioré afin de pouvoir obtenir une subdivision plus juste des régions corticales. Ceci pourrait permettre de tenir compte de certains blocs qui apparaissent lors du partitionnement de la connectivité fonctionnelle. Finalement, un modèle statistique mieux adapté à la structure des données recueillies et ne faisant pas d'approximation quant à l'indépendance des données provenant d'un même individu permettrait d'effectuer des analyses statistiques plus robustes et d'analyser les interactions entre différents paramètres dont l'âge des souris, les régions corticales, le type de connectivité et le système imagé.

Une extension naturelle du travail fait ici serait de répéter des analyses similaires pour des données n'étant pas obtenues chez des souris à l'état de repos, mais plutôt qui accomplissent une tâche spécifique ou qui sont sous l'effet de stimuli précis. Cela permettrait d'analyser les patrons de connectivité au cours d'activité corticale plus complexe et ainsi d'étudier comment les métriques discutées ici varient selon le comportement du sujet, ce qui constitue un volet crucial de la neuroscience. Non seulement les analyses s'en trouveraient bonifiées, mais de disposer de telles données permettrait du même coup d'améliorer le co-enregistrement en l'effectuant de manière fonctionnelle, en faisant correspondre des patrons d'activité connus avec des régions corticales. Cela permettrait aussi d'effectuer une division des états n'étant pas seulement basée sur des mesures corticales ou de pupille, mais sur des facteurs expérimentaux externes mesurables comme l'état comportemental ou la présence ou non de stimuli. Une multitude d'exemples dans la littérature montrent une dynamique temporelle riche de l'activité corticale durant des tâches comportementales, qui pourrait être analysée avec des méthodes similaires aux nôtres ou encore avec des outils comme l'analyse par composantes principales, qui est couramment utilisée en neurosciences et qui serait potentiellement appropriée pour

révéler les différents facteurs intervenant dans la dynamique corticale. Ces dynamiques pourraient en outre être médiées par des systèmes neuromodulateurs impliqués dans la vigilance et l'état global du cortex, tels que les systèmes noradrénergique et cholinergique, ce qui constitue une piste importante pour de futurs travaux.

Aussi, le lien structure-fonction fait toujours l'objet de nombreuses études en neuroscience. Nous ne disposons peut-être pas de méthodes afin d'extraire le connectome structurel comme nous le faisons pour la connectivité fonctionnelle, mais plusieurs connectomes structurels du cortex de la souris sont déjà connus. La procédure que nous employons afin de segmenter les états de la souris serait tout fait applicable à l'étude du lien entre la connectivité structurelle et la connectivité fonctionnelle. En effet, il serait possible que ce lien soit plus fort à certains moments précis, sous certains stimuli, durant certains états comportementaux ou sous l'influence de neuromodulation.

Les résultats discutés ici montrent que les systèmes neuronal et vasculaire possèdent des interactions complexes et une organisation propre à chacun qui dépendent de plusieurs paramètres, mais de telles extensions de notre travail permettraient d'accroître encore notre compréhension de l'unité neurovasculaire. Compte tenu de son importance particulière en ce qui concerne bon nombre de maladies et de techniques d'imagerie appliquées dans un contexte clinique, les techniques développées dans ce mémoire constituent une approche méthodologique prometteuse pour l'étude quantitative et dynamique du système neurovasculaire.

Bibliographie

- [1] Morphology filters. https://www.theobjects.com/dragonfly/dfhelp/3-5/Content/05_Image%20Processing/Morphology%20Filters.htm, n.d. Object Research Systems.
- [2] W. B. ABERNETHY, M. A. BELL, M. MORRIS et D. M. MOODY : Microvascular density of the human paraventricular nucleus decreases with aging but not hypertension. *Experimental Neurology*, 121(2):270–274, june 1993.
- [3] AGENCE DES MÉDICAMENTS DU CANADA : Ct and mri examination volumes in canada : National performance insights. <https://www.canjhealthtechnol.ca/index.php/cjht/article/view/CM0029>, oct. 2025. Canadian Journal of Health Technologies.
- [4] A. AHMAD, V. PATEL, J. XIAO et M. M. KHAN : The role of neurovascular system in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*, 57(11):4373–4393, nov. 2020.
- [5] R. ARONOFF, F. MATYAS, C. MATEO, C. CIRON, B. SCHNEIDER et C. C. PETERSEN : Long-range connectivity of mouse primary somatosensory barrel cortex. *European Journal of Neuroscience*, 31(12):2221–2233, june 2010.
- [6] F. ATRY, R. C.-H. CHEN, J. PISANIELLO, S. BRODNICK, A. J. SUMINSKI, J. NOVELLO, J. NESS, J. C. WILLIAMS et R. PASHAIE : Optogenetic interrogation of neurovascular coupling in the cerebral cortex of transgenic mice. *Journal of Neural Engineering*, 15(5): 056033, oct. 2018.
- [7] J. A. BAE, M. BAPTISTE, M. R. BAPTISTE, C. A. BISHOP, A. L. BODOR, D. BRITTAIN, V. BROOKS, J. BUCHANAN, D. J. BUMBARGER, M. A. CASTRO, B. CELII, E. COBOS, F. COLLMAN, N. M. da COSTA, B. DANSKIN, S. DORKENWALD, L. ELABBADY, P. G. FAHEY, T. FLISS, E. FROUDARAKIS, J. GAGER, C. GAMLIN, W. GRAY-RONCAL, A. HALAGERI, J. HEBDITCH, Z. JIA, E. JOYCE, J. ELLIS-JOYCE, C. JORDAN, D. KAPNER, N. KEMNITZ, S. KINN, L. M. KITCHELL, S. KOOLMAN, K. KUEHNER, K. LEE, K. LI, R. LU, T. MACRINA, G. MAHALINGAM, J. MATELSKY, S. McREYNOLDS, E. MIRANDA, E. MITCHELL, S. S. MONDAL, M. MOORE, S. MU, T. MUHAMMAD, B. NEHORAN, E. NEACE, O. OGEDENGBE, C. PAPADOPOULOS, S. PAPADOPOULOS, S. PATEL, G. J.

- Y. P. VEGA, X. PITKOW, S. POPOVYCH, A. RAMOS, R. C. REID, J. REIMER, P. K. RIVLIN, V. ROSE, Z. M. SAUTER, C. M. SCHNEIDER-MIZELL, H. S. SEUNG, B. SILVERMAN, W. SILVERSMITH, A. STERLING, F. H. SINZ, C. L. SMITH, R. SWANSTROM, S. SUCKOW, M. TAKENO, Z. H. TAN, A. S. TOLIAS, R. TORRES, N. L. TURNER, E. Y. WALKER, T. WANG, A. WANNER, B. A. WESTER, G. WILLIAMS, S. WILLIAMS, K. WILLIE, R. WILLIE, W. WONG, J. WU, C. XU, R. YANG, D. YATSENKO, F. YE, W. YIN, R. YOUNG, S.-c. YU, D. XENES, C. ZHANG et T. M. CONSORTIUM : Functional connectomics spanning multiple areas of mouse visual cortex. *Nature*, 640(8058):435–447, avr. 2025.
- [8] M. BALBI, M. GHOSH, T. A. LONGDEN, M. J. VEGA, B. GESIERICH, F. HELLAL, A. LOURBOPOULOS, M. T. NELSON et N. PLESNILA : Dysfunction of mouse cerebral arteries during early aging. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(9):1445–1453, sept 2015.
- [9] J. H. BALSTERS, V. ZERBI, J. SALLET, N. WENDEROTH et R. B. MARS : Primate homologs of mouse cortico-striatal circuits. *eLife*, 9:e53680, avr. 2020.
- [10] M. V. BANDET, B. DONG et I. R. WINSHIP : Distinct patterns of activity in individual cortical neurons and local networks in primary somatosensory cortex of mice evoked by square-wave mechanical limb stimulation. *PLOS ONE*, 16(4):e0236684, avr. 2021.
- [11] S. A. BANSE et C. P. HUNTER : Vampiric isolation of extracellular fluid from caenorhabditis elegans. *Journal of Visualized Experiments*, (61):3647, mars 2012.
- [12] D. S. BASSETT et O. SPORNS : Network neuroscience. *Nature neuroscience*, 20(3):353–364, 2017.
- [13] M. E. BELLOY, M. NAEYAERT, A. ABBAS, D. SHAH, V. VANREUSEL, J. VAN AUDEKERKE, S. D. KEILHOLZ, G. A. KELIRIS, A. VAN DER LINDEN et M. VERHOYE : Dynamic resting state fmri analysis in mice reveals a set of quasi-periodic patterns and illustrates their relationship with the global signal. *NeuroImage*, 180:463–484, oct. 2018.
- [14] H. C. BENNETT, Q. ZHANG, Y.-t. WU, S. B. MANJILA, U. CHON, D. SHIN, D. J. VANSELOW, H.-J. PI, P. J. DREW et Y. KIM : Aging drives cerebrovascular network remodeling and functional changes in the mouse brain. *Nature Communications*, 15(1): 6398, july 2024.
- [15] D. BENOZZO, G. BARON, L. COLETTA, A. CHIUSO, A. GOZZI et A. BERTOLDO : Macro-scale coupling between structural and effective connectivity in the mouse brain. *Scientific Reports*, 14(1):3142, fév. 2024.
- [16] M. J. BETTS, E. KIRILINA, M. C. G. OTADUY, D. IVANOV, J. ACOSTA-CABRONERO, M. F. CALLAGHAN, C. LAMBERT, A. CARDENAS-BLANCO, K. PINE, L. PASSAMONTI,

- C. LOANE, M. C. KEUKEN, P. TRUJILLO, F. LÜSEBRINK, H. MATTERN, K. Y. LIU, N. PRIOVOULOS, K. FLIESSBACH, M. J. DAHL, A. MAASS, C. F. MADELUNG, D. MENDER, A. J. EHRENBERG, O. SPECK, N. WEISKOPF, R. DOLAN, B. INGLIS, D. TOSUN, M. MORAWSKI, F. A. ZUCCA, H. R. SIEBNER, M. MATHER, K. ULUDAG, H. HEINSEN, B. A. POSER, R. HOWARD, L. ZECCA, J. B. ROWE, L. T. GRINBERG, H. I. L. JACOBS, E. DÜZEL et D. HÄMMERER : Locus coeruleus imaging as a biomarker for noradrenergic dysfunction in neurodegenerative diseases. *Brain*, 142(9):2558–2571, sept 2019.
- [17] P. BLINDER, P. S. TSAI, J. P. KAUFHOLD, P. M. KNUTSEN, H. SUHL et D. KLEINFELD : The cortical angiome : an interconnected vascular network with noncolumnar patterns of blood flow. *Nature Neuroscience*, 16(7):889–897, july 2013.
- [18] M. BOTA, O. SPORNS et L. W. SWANSON : Architecture of the cerebral cortical association connectome underlying cognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(16), avr. 2015.
- [19] V. BRETON-PROVENCHER et M. SUR : Active control of arousal by a locus coeruleus gabaergic circuit. *Nature Neuroscience*, 22(2):218–228, fév. 2019.
- [20] R. B. BUXTON, K. ULUDAĞ, D. J. DUBOWITZ et T. T. LIU : Modeling the hemodynamic response to brain activation. *NeuroImage*, 23:S220–S233, 2004.
- [21] E. CALABRESE, A. BADEA, G. COFER, Y. QI et G. A. JOHNSON : A diffusion mri tractography connectome of the mouse brain and comparison with neuronal tracer data. *Cerebral cortex*, 25(11):4628–4637, 2015.
- [22] CANADIAN AGENCY FOR DRUGS AND TECHNOLOGIES IN HEALTH : Canadian medical imaging inventory 2022–2023 : Mri. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK607344/>, 2024.
- [23] CANADIAN INSTITUTES OF HEALTH RESEARCH : Cihr institute of aging strategic plan 2023–2028. <https://cihr-irsc.gc.ca/e/46837.html>, mai 2025.
- [24] L. CARRILLO-REID, J.-e. K. MILLER, J. P. HAMM, J. JACKSON et R. YUSTE : Endogenous sequential cortical activity evoked by visual stimuli. *Journal of Neuroscience*, 35(23):8813–8828, june 2015.
- [25] B. CAULI : Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling. *Frontiers in Neuroenergetics*, 2, 2010.
- [26] B. CAULI, X.-K. TONG, A. RANCILLAC, N. SERLUCA, B. LAMBOLEZ, J. ROSSIER et E. HAMEL : Cortical gaba interneurons in neurovascular coupling : Relays for subcortical vasoactive pathways. *The Journal of Neuroscience*, 24(41):8940–8949, oct. 2004.

- [27] M. N. CECYN et K. P. ABRAHAO : Where do you measure the bregma for rodent stereotaxic surgery ? *IBRO Neuroscience Reports*, 15:143–148, juil. 2023.
- [28] S. CHAKRABARTI, M. ZHANG et K. D. ALLOWAY : Mi neuronal responses to peripheral whisker stimulation : Relationship to neuronal activity in si barrels and septa. *Journal of Neurophysiology*, 100(1):50–63, july 2008.
- [29] C. CHANG, D. A. LEOPOLD, M. L. SCHÖLVINCK, H. MANDELKOW, D. PICCHIONI, X. LIU, F. Q. YE, J. N. TURCHI et J. H. DUYN : Tracking brain arousal fluctuations with fmri. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(16):4518–4523, avr. 2016.
- [30] T.-W. CHEN, T. J. WARDILL, Y. SUN, S. R. PULVER, S. L. RENNINGER, A. BAOHAN, E. R. SCHREITER, R. A. KERR, M. B. ORGER, V. JAYARAMAN, L. L. LOOGER, K. SVOBODA et D. S. KIM : Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458):295–300, juil. 2013.
- [31] L. COLETTA, M. PAGANI, J. D. WHITESELL, J. A. HARRIS, B. BERNHARDT et A. GOZZI : Network structure of the mouse brain connectome with voxel resolution. *Science advances*, 6(51):eabb7187, 2020.
- [32] D. CORDES, V. M. HAUGHTON, K. ARFANAKIS, G. J. WENDT, P. A. TURSKI, C. H. MORITZ, M. A. QUIGLEY et M. E. MEYERAND : Mapping functionally related regions of brain with functional connectivity mr imaging. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 21(9):1636–1644, oct. 2000.
- [33] J. S. DAMOISEAUX : Effects of aging on functional and structural brain connectivity. *NeuroImage*, 160:32–40, oct. 2017.
- [34] L. DE LECEA, M. E. CARTER et A. ADAMANTIDIS : Shining light on wakefulness and arousal. *Biological Psychiatry*, 71(12):1046–1052, june 2012.
- [35] G. DECO, P. HAGMANN, A. G. HUDETZ et G. TONONI : Modeling resting-state functional networks when the cortex falls asleep : Local and global changes. *Cerebral Cortex*, 24(12):3180–3194, déc. 2014.
- [36] C. DEL PERCIO, W. DRINKENBURG, S. LOPEZ, F. INFARINATO, J. F. BASTLUND, B. LAURSEN, J. T. PEDERSEN, D. Z. CHRISTENSEN, G. FORLONI, A. FRASCA, F. M. NOÈ, M. BENTIVOGLIO, P. F. FABENE, G. BERTINI, V. COLAVITO, J. KELLEY, S. DIX, J. C. RICHARDSON et C. BABILONI : On-going electroencephalographic rhythms related to cortical arousal in wild-type mice : the effect of aging. *Neurobiology of Aging*, 49:20–30, jan. 2017.

- [37] M. DESJARDINS, R. BERTI, J. LEFEBVRE, S. DUBEAU et F. LESAGE : Aging-related differences in cerebral capillary blood flow in anesthetized rats. *Neurobiology of aging*, 35(8):1947–1955, 2014.
- [38] A. DEVOR, A. K. DUNN, M. L. ANDERMANN, I. ULBERT, D. A. BOAS et A. M. DALE : Coupling of total hemoglobin concentration, oxygenation, and neural activity in rat somatosensory cortex. *Neuron*, 39(2):353–359, july 2003.
- [39] A. DEVOR, P. TIAN, N. NISHIMURA, I. C. TENG, E. M. C. HILLMAN, S. N. NARAYANAN, I. ULBERT, D. A. BOAS, D. KLEINFELD et A. M. DALE : Suppressed neuronal activity and concurrent arteriolar vasoconstriction may explain negative blood oxygenation level-dependent signal. *The Journal of Neuroscience*, 27(16):4452–4459, avr. 2007.
- [40] A. DEVOR, I. ULBERT, A. K. DUNN, S. N. NARAYANAN, S. R. JONES, M. L. ANDERMANN, D. A. BOAS et A. M. DALE : Coupling of the cortical hemodynamic response to cortical and thalamic neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(10):3822–3827, mars 2005.
- [41] B. ELLENBROEK et J. YOUN : Rodent models in neuroscience research : is it a rat race ? *Disease Models & Mechanisms*, 9(10):1079–1087, oct. 2016.
- [42] A. D. ELSTER : Bold and brain activity : Does the bold response result from the firing of nerve cells? <https://mriquestions.com/does-boldbrain-activity.html>, n.d. Questions and Answers in MRI.
- [43] A. C. ENGSTROM, A. KAPOOR, S. DUTT, J. P. M. ALITIN, T. LOHMAN, A. GAUBERT, I. SIBLE, A. J. MARSHALL, F. SHENASA, J. L. JOYCE, X. SHAO, D. J. WANG et D. A. NATION : Age differences in spontaneous cerebrovascular reactivity at rest. *Alzheimer's & Dementia*, 21(S1):e101198, déc. 2025.
- [44] M. FABIANI, B. A. GORDON, E. L. MACLIN, M. A. PEARSON, C. R. BRUMBACK-PELTZ, K. A. LOW, E. MCAULEY, B. P. SUTTON, A. F. KRAMER et G. GRATTON : Neurovascular coupling in normal aging : A combined optical, erp and fmri study. *NeuroImage*, 85:592–607, jan. 2014.
- [45] J. FASKOWITZ, F. Z. ESFAHLANI, Y. JO, O. SPORNS et R. F. BETZEL : Edge-centric functional network representations of human cerebral cortex reveal overlapping system-level architecture. *Nature Neuroscience*, 23(12):1644–1654, oct. 2020.
- [46] J. FENG, C. ZHANG, J. E. LISCHINSKY, M. JING, J. ZHOU, H. WANG, Y. ZHANG, A. DONG, Z. WU, H. WU, W. CHEN, P. ZHANG, J. ZOU, S. A. HIRES, J. J. ZHU, G. CUI, D. LIN, J. DU et Y. LI : A genetically encoded fluorescent sensor for rapid and specific in vivo detection of norepinephrine. *Neuron*, 102(4):745–761.e8, mai 2019.

- [47] A. FIELD : *Discovering Statistics Using SPSS*. SAGE Publications, jan. 2009. Google-Books-ID : a6FLF1YOqtsC.
- [48] R. A. FISHER : *Statistical Methods for Research Workers*, p. 66–70. Springer, New York, NY, 1992.
- [49] M. FRIEDMAN : The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *Journal of the American Statistical Association*, 32(200):675–701, déc. 1937.
- [50] K. FRISTON, L. HARRISON et W. PENNY : Dynamic causal modelling. *NeuroImage*, 19(4):1273–1302, août 2003.
- [51] A. GHOLIPOUR, N. KEHTARNAVAZ, R. BRIGGS, M. DEVOUS et K. GOPINATH : Brain functional localization : A survey of image registration techniques. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 26(4):427–451, avr. 2007.
- [52] J. P. GILMAN, M. MEDALLA et J. I. LUEBKE : Area-specific features of pyramidal neurons—a comparative study in mouse and rhesus monkey. *Cerebral Cortex*, p. bhw062, mars 2016.
- [53] A. GOZZI et A. J. SCHWARZ : Large-scale functional connectivity networks in the rodent brain. *NeuroImage*, 127:496–509, fév. 2016.
- [54] J. GRANDJEAN, V. ZERBI, J. H. BALSTERS, N. WENDEROTH et M. RUDIN : Structural basis of large-scale functional connectivity in the mouse. *The Journal of Neuroscience*, 37(34):8092–8101, août 2017.
- [55] J. GRINBAND, J. STEFFENER, Q. R. RAZLIGHI et Y. STERN : Bold neurovascular coupling does not change significantly with normal aging. *Human Brain Mapping*, 38(7): 3538–3551, july 2017.
- [56] Y. GU, F. HAN et X. LIU : Arousal contributions to resting-state fmri connectivity and dynamics. *Frontiers in Neuroscience*, 13:1190, nov. 2019.
- [57] M. GUIDI, F. MANGINI, M. MORASCHI, D. MASCALI, M. FRATINI, S. MANGIA, F. FREZZA et F. GIOVE : Towards whole brain mapping of the hemodynamic response function. In *2023 ISMRM & ISMRT Annual Meeting*, p. 1175, Toronto, ON, Canada, 2023.
- [58] R. GĂMĂNUȚ, H. KENNEDY, Z. TOROCZKAI, M. ERCSEY-RAVASZ, D. C. VAN ESSEN, K. KNOBLAUCH et A. BURKHALTER : The mouse cortical connectome, characterized by an ultra-dense cortical graph, maintains specificity by distinct connectivity profiles. *Neuron*, 97(3):698–715.e10, fév. 2018.

- [59] H.-C. HAN : Twisted blood vessels : symptoms, etiology and biomechanical mechanisms. *Journal of Vascular Research*, 49(3):185–197, 2012.
- [60] S. HOLM : A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statist*, 1979.
- [61] L. HUANG, P. LEDOCHOWITSCH, U. KNOBLICH, J. LECOQ, G. J. MURPHY, R. C. REID, S. E. DE VRIES, C. KOCH, H. ZENG, M. A. BUICE, J. WATERS et L. LI : Relationship between simultaneously recorded spiking activity and fluorescence signal in gcamp6 transgenic mice. *eLife*, 10:e51675, mars 2021.
- [62] Y. HUANG, X. ZHANG et W. LI : Involvement of primary somatosensory cortex in motor learning and task execution. *Neuroscience Letters*, 828:137753, avr. 2024.
- [63] C. IADECOLA : The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathologica*, 120(3):287–296, sept 2010.
- [64] C. IADECOLA : The neurovascular unit coming of age : a journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron*, 96(1):17–42, sept 2017.
- [65] S. JOSHI, Y. LI, R. KALWANI et J. GOLD : Relationships between pupil diameter and neuronal activity in the locus coeruleus, colliculi, and cingulate cortex. *Neuron*, 89(1): 221–234, jan. 2016.
- [66] C. K. KIM, S. J. YANG, N. PICHAMOORTHY, N. P. YOUNG, I. KAUVAR, J. H. JENNINGS, T. N. LERNER, A. BERNDT, S. Y. LEE, C. RAMAKRISHNAN, T. J. DAVIDSON, M. INOUE, H. BITO et K. DEISSEROTH : Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nature Methods*, 13(4):325–328, avr. 2016.
- [67] K. J. KIM, J. RAMIRO DIAZ, J. A. IDDINGS et J. A. FILOSA : Vasculo-neuronal coupling : Retrograde vascular communication to brain neurons. *The Journal of Neuroscience*, 36(50):12624–12639, déc. 2016.
- [68] J. E. KNOX, K. D. HARRIS, N. GRADDIS, J. D. WHITESELL, H. ZENG, J. A. HARRIS, E. SHEA-BROWN et S. MIHALAS : High-resolution data-driven model of the mouse connectome. *Network Neuroscience*, 3(1):217–236, jan. 2019.
- [69] M.-E. LARAMÉE et D. BOIRE : Visual cortical areas of the mouse : comparison of parcellation and network structure with primates. *Frontiers in Neural Circuits*, 8, jan. 2015.
- [70] C. C. Y. LEE, E. KHERADPEZHOUH, M. E. DIAMOND et E. ARABZADEH : State-dependent changes in perception and coding in the mouse somatosensory cortex. *Cell Reports*, 32(13):108197, 2020.

- [71] C. R. LEE et D. J. MARGOLIS : Pupil dynamics reflect behavioral choice and learning in a go/nogo tactile decision-making task in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, nov. 2016.
- [72] Y. LI, W. J. CHOI, W. WEI, S. SONG, Q. ZHANG, J. LIU et R. K. WANG : Aging-associated changes in cerebral vasculature and blood flow as determined by quantitative optical coherence tomography angiography. *Neurobiology of aging*, 70:148–159, oct. 2018.
- [73] A. LISKA, A. GALBUSERA, A. J. SCHWARZ et A. GOZZI : Functional connectivity hubs of the mouse brain. *NeuroImage*, 115:281–291, july 2015.
- [74] Y. LIU, X. ZHU, D. FEINBERG, M. GUENTHER, J. GREGORI, M. W. WEINER et N. SCHUFF : Arterial spin labeling mri study of age and gender effects on brain perfusion hemodynamics. *Magnetic Resonance in Medicine*, 68(3):912–922, sept 2012.
- [75] S. LOOMBA, J. STRAEHLE, V. GANGADHARAN, N. HEIKE, A. KHALIFA, A. MOTTA, N. JU, M. SIEVERS, J. GEMPT, H. S. MEYER et M. HELMSTAEDTER : Connectomic comparison of mouse and human cortex. *Science*, 377(6602):eabo0924, july 2022.
- [76] M. R. LOWERISON, N. V. C. SEKARAN, W. ZHANG, Z. DONG, X. CHEN, D. A. LLANO et P. SONG : Aging-related cerebral microvascular changes visualized using ultrasound localization microscopy in the living mouse. *Scientific Reports*, 12(1):619, jan. 2022.
- [77] D. G. LYONS, A. PARPALEIX, M. ROCHE et S. CHARPAK : Mapping oxygen concentration in the awake mouse brain. *eLife*, 5:e12024, fév. 2016.
- [78] M. LÖVDÉN, F. SCHMIEDEK, K. M. KENNEDY, K. M. RODRIGUE, U. LINDENBERGER et N. RAZ : Does variability in cognitive performance correlate with frontal brain volume ? *NeuroImage*, 64:209–215, jan. 2013.
- [79] Y. MA, M. A. SHAIK, S. H. KIM, M. G. KOZBERG, D. N. THIBODEAUX, H. T. ZHAO, H. YU et E. M. C. HILLMAN : Wide-field optical mapping of neural activity and brain haemodynamics : considerations and novel approaches. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 371(1705):20150360, oct. 2016.
- [80] Y. MA, M. A. SHAIK, M. G. KOZBERG, S. H. KIM, J. P. PORTES, D. TIMERMAN et E. M. C. HILLMAN : Resting-state hemodynamics are spatiotemporally coupled to synchronized and symmetric neural activity in excitatory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(52), déc. 2016.
- [81] M. E. MACDONALD et G. B. PIKE : Mri of healthy brain aging : A review. *NMR in Biomedicine*, 34(9):e4564, 2021.
- [82] M. E. MACDONALD, R. J. WILLIAMS, D. RAJASHEKAR, R. B. STAFFORD, A. HANGANU, H. SUN, A. J. L. BERMAN, C. R. MCCREARY, R. FRAYNE, N. D. FORKERT et G. B.

- PIKE : Age-related differences in cerebral blood flow and cortical thickness with an application to age prediction. *Neurobiology of Aging*, 95:131–142, nov. 2020.
- [83] H. B. MANN et D. R. WHITNEY : On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18(1):50–60, mars 1947.
 - [84] J. MARSHALL, M. GARRETT, I. NAUHAUS et E. CALLAWAY : Functional specialization of seven mouse visual cortical areas. *Neuron*, 72(6):1040–1054, déc. 2011.
 - [85] F. MATYAS, V. SREENIVASAN, F. MARBACH, C. WACONGNE, B. BARSY, C. MATEO, R. ARONOFF et C. C. H. PETERSEN : Motor control by sensory cortex. *Science*, 330(6008):1240–1243, nov. 2010.
 - [86] R. A. MCLEAN, W. L. SANDERS et W. W. STROUP : A unified approach to mixed linear models. *The American Statistician*, 45(1):54–64, fév. 1991.
 - [87] M. MEGEMONT, J. MCBURNEY-LIN et H. YANG : Pupil diameter is not an accurate real-time readout of locus coeruleus activity. *eLife*, 11:e70510, fév. 2022.
 - [88] F. MELOZZI, E. BERGMANN, J. A. HARRIS, I. KAHN, V. JIRSA et C. BERNARD : Individual structural features constrain the mouse functional connectome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(52):26961–26969, déc. 2019.
 - [89] L. MEYER-BAESE, A. E. MORRISSETTE, Y. WANG, B. LE CHATELIER, P. Y. BORDEN, S. D. KEILHOLZ, G. B. STANLEY et D. JAEGER : Cortical networks relating to arousal are differentially coupled to neural activity and hemodynamics. *The Journal of Neuroscience*, 44(25):e0298232024, june 2024.
 - [90] M. E. J. NEWMAN : Modularity and community structure in networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(23):8577–8582, june 2006.
 - [91] J. NI et J. L. CHEN : Long-range cortical dynamics : a perspective from the mouse sensorimotor whisker system. *European Journal of Neuroscience*, 46(8):2315–2324, oct. 2017.
 - [92] S. W. OH, J. A. HARRIS, L. NG, B. WINSLOW, N. CAIN, S. MIHALAS, Q. WANG, C. LAU, L. KUAN, A. M. HENRY, M. T. MORTTRUD, B. OUELLETTE, T. N. NGUYEN, S. A. SORENSEN, C. R. SLAUGHTERBECK, W. WAKEMAN, Y. LI, D. FENG, A. HO, E. NICHOLAS, K. E. HIROKAWA, P. BOHN, K. M. JOINES, H. PENG, M. J. HAWRYLYCZ, J. W. PHILLIPS, J. G. HOHMANN, P. WOHNOUTKA, C. R. GERFEN, C. KOCH, A. BERNARD, C. DANG, A. R. JONES et H. ZENG : A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 508(7495):207–214, avr. 2014.

- [93] S.-L. PENG, X. CHEN, Y. LI, K. M. RODRIGUE, D. C. PARK et H. LU : Age-related changes in cerebrovascular reactivity and their relationship to cognition : A four-year longitudinal study. *NeuroImage*, 174:257–262, july 2018.
- [94] G. PFURTSCHELLER et F. H. Lopes da SILVA : Event-related eeg/meg synchronization and desynchronization : basic principles. *Clinical Neurophysiology*, 110(11):1842–1857, nov. 1999.
- [95] S. PRAHL : Tabulated molar extinction coefficient for hemoglobin in water. <https://omlc.org/spectra/hemoglobin/summary.html>, n.d. Oregon Medical Laser Center.
- [96] A. RAKYMZHAN, Y. LI, P. TANG et R. K. WANG : Optical microangiography reveals temporal and depth-resolved hemodynamic change in mouse barrel cortex during whisker stimulation. *Journal of Biomedical Optics*, 25(9):096005, sept 2020.
- [97] B. C. RAUSCHER, N. FOMIN-THUNEMANN, S. KURA, P. R. DORAN, P. D. PEREZ, K. KILIÇ, E. A. MARTIN, D. BALOG, N. X. CHAI et F. A. FROIO : Neurovascular impulse response function (irf) during spontaneous activity differentially reflects intrinsic neuromodulation across cortical regions, 2024. bioRxiv preprint.
- [98] J. REIMER, E. FROUDARAKIS, C. CADWELL, D. YATSENKO, G. DENFIELD et A. TOLIAS : Pupil fluctuations track fast switching of cortical states during quiet wakefulness. *Neuron*, 84(2):355–362, oct. 2014.
- [99] B. ROSENGARTEN, C. ALDINGER, A. SPILLER et M. KAPS : Neurovascular coupling remains unaffected during normal aging. *Journal of Neuroimaging*, 13(1):43–47, jan. 2003.
- [100] M. RUBINOV et O. SPORNS : Complex network measures of brain connectivity : uses and interpretations. *Neuroimage*, 52(3):1059–1069, 2010.
- [101] M. RUBINOV et O. SPORNS : Weight-conserving characterization of complex functional brain networks. *NeuroImage*, 56(4):2068–2079, june 2011.
- [102] M. RUBINOV, R. J. F. YPMA, C. WATSON et E. T. BULLMORE : Wiring cost and topological participation of the mouse brain connectome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(32):10032–10037, août 2015.
- [103] A. SAIKI, R. KIMURA, T. SAMURA, Y. FUJIWARA-TSUKAMOTO, Y. SAKAI et Y. ISOMURA : Different modulation of common motor information in rat primary and secondary motor cortices. *PLoS ONE*, 9(6):e98662, june 2014.
- [104] J. N. SANES et J. P. DONOGHUE : Plasticity and primary motor cortex. *Annual Review of Neuroscience*, 23(1):393–415, mars 2000.

- [105] S. SARA et S. BOURET : Orienting and reorienting : The locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron*, 76(1):130–141, oct. 2012.
- [106] S. SCHAEFFER et C. IADECOLA : Revisiting the neurovascular unit. *Nature Neuroscience*, 24(9):1198–1209, sept 2021.
- [107] F. SCHMID, M. J. BARRETT, P. JENNY et B. WEBER : Vascular density and distribution in neocortex. *NeuroImage*, 197:792–805, août 2019.
- [108] N. D. SHELCHKOVA, J. E. DOWNEY, C. M. GREENSPON, E. V. OKOROKOVA, A. R. SOBINOV, C. VERBAARSCHOT, Q. HE, C. SPONHEIM, A. F. TORTOLANI, D. D. MOORE, M. T. KAUFMAN, R. C. LEE, D. SATZER, J. GONZALEZ-MARTINEZ, P. C. WARNKE, L. E. MILLER, M. L. BONINGER, R. A. GAUNT, J. L. COLLINGER, N. G. HATSOPOULOS et S. J. BENSMAIA : Microstimulation of human somatosensory cortex evokes task-dependent, spatially patterned responses in motor cortex. *Nature Communications*, 14(1):7270, nov. 2023.
- [109] J. SINCLAIR et I. HAMZA : Lessons from bloodless worms : heme homeostasis in *c. elegans*. *BioMetals*, 28(3):481–489, june 2015.
- [110] Y. B. SIROTIN et A. DAS : Anticipatory haemodynamic signals in sensory cortex not predicted by local neuronal activity. *Nature*, 457(7228):475–479, jan. 2009.
- [111] H. SLOAN, V. AUSTIN, A. BLAMIRE, J. SCHNUPP, A. LOWE, K. ALLERS, P. MATTHEWS et N. SIBSON : Regional differences in neurovascular coupling in rat brain as determined by fmri and electrophysiology. *NeuroImage*, 53(2):399–411, nov. 2010.
- [112] O. SPORNS : Structure and function of complex brain networks. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 15(3):247–262, sept 2013.
- [113] V. SREENIVASAN, K. KARMAKAR, F. M. RIJLI et C. C. H. PETERSEN : Parallel pathways from motor and somatosensory cortex for controlling whisker movements in mice. *The European Journal of Neuroscience*, 41(3):354–367, fév. 2015.
- [114] I. STITT, Z. C. ZHOU, S. RADTKE-SCHULLER et F. FRÖHLICH : Arousal dependent modulation of thalamo-cortical functional interaction. *Nature Communications*, 9(1):2455, june 2018.
- [115] C. STRINGER, M. PACHITARIU, N. STEINMETZ, C. B. REDDY, M. CARANDINI et K. D. HARRIS : Spontaneous behaviors drive multidimensional, brainwide activity. *Science*, 364(6437):eaav7893, avr. 2019.
- [116] P. SUTER, H. LUETKEMEIER, N. ZAKOVA, P. CHRISTEN, K. SACHSSE et R. HESS : Lifespan studies on male and female mice and rats under spf-laboratory conditions.

- In P. L. CHAMBERS et P. GÜNZEL, édés : *Mechanism of Toxic Action on Some Target Organs*, p. 403–407, Berlin, Heidelberg, 1979. Springer Berlin Heidelberg.
- [117] L. E. SUÁREZ, R. D. MARKELLO, R. F. BETZEL et B. MISIC : Linking structure and function in macroscale brain networks. *Trends in Cognitive Sciences*, 24(4):302–315, avr. 2020.
 - [118] M. D. SWEENEY, K. KISLER, A. MONTAGNE, A. W. TOGA et B. V. ZLOKOVIC : The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nature Neuroscience*, 21(10):1318–1331, oct. 2018.
 - [119] A. SYEDA, L. ZHONG, R. TUNG, W. LONG, M. PACHITARIU et C. STRINGER : Facemap : a framework for modeling neural activity based on orofacial tracking. *Nature Neuroscience*, 27(1):187–195, jan. 2024.
 - [120] K. TAMURA, P. BECH, H. MIZUNO, L. VEAUTE, S. CROCHET et C. C. H. PETERSEN : Cell-class-specific orofacial motor maps in mouse neocortex. *Current Biology*, 35(6):1382–1390.e5, mars 2025.
 - [121] A. J. TAYLOR, J. H. KIM et D. RESS : Characterization of the hemodynamic response function across the majority of human cerebral cortex. *NeuroImage*, 173:322–331, june 2018.
 - [122] S.-I. TERADA, K. KOBAYASHI et M. MATSUZAKI : Transition of distinct context-dependent ensembles from secondary to primary motor cortex in skilled motor performance. *Cell Reports*, 41(3):111494, oct. 2022.
 - [123] UNITED NATIONS POPULATION DIVISION : United nations population division data portal. <https://population.un.org/dataportal/home?df=658e323f-2db0-4333-b3b6-a635a17d38b5>, n.d. Online data portal.
 - [124] I. VANZETTA : Hemodynamic responses in cortex investigated with optical imaging methods. implications for functional brain mapping. *Journal of Physiology-Paris*, 100(4):201–211, oct. 2006.
 - [125] Q. WANG, S.-L. DING, Y. LI, J. ROYALL, D. FENG, P. LESNAR, N. GRADDIS, M. NAEEMI, B. FACER, A. HO, T. DOLBEARE, B. BLANCHARD, N. DEE, W. WAKEMAN, K. E. HIROKAWA, A. SZAFAER, S. M. SUNKIN, S. W. OH, A. BERNARD, J. W. PHILLIPS, M. HAWRYLYCZ, C. KOCH, H. ZENG, J. A. HARRIS et L. NG : The allen mouse brain common coordinate framework : A 3d reference atlas. *Cell*, 181(4):936–953.e20, mai 2020.
 - [126] B. R. WHITE, A. Q. BAUER, A. Z. SNYDER, B. L. SCHLAGGAR, J.-M. LEE et J. P. CULVER : Imaging of functional connectivity in the mouse brain. *PLoS ONE*, 6(1):e16322, jan. 2011.

- [127] J. D. WHITESELL, A. LISKA, L. COLETTA, K. E. HIROKAWA, P. BOHN, A. WILLIFORD, P. A. GROBLEWSKI, N. GRADDIS, L. KUAN, J. E. KNOX, A. HO, W. WAKEMAN, P. R. NICOVICH, T. N. NGUYEN, C. T. VAN VELTHOVEN, E. GARREN, O. FONG, M. NAEEMI, A. M. HENRY, N. DEE, K. A. SMITH, B. LEVI, D. FENG, L. NG, B. TASIC, H. ZENG, S. MIHALAS, A. GOZZI et J. A. HARRIS : Regional, layer, and cell-type-specific connectivity of the mouse default mode network. *Neuron*, 109(3):545–559.e8, fév. 2021.
- [128] F. WILCOXON : Individual comparisons of grouped data by ranking methods. *Journal of Economic Entomology*, 39:269, avr. 1946.
- [129] P. W. WRIGHT, L. M. BRIER, A. Q. BAUER, G. A. BAXTER, A. W. KRAFT, M. D. REISMAN, A. R. BICE, A. Z. SNYDER, J.-M. LEE et J. P. CULVER : Functional connectivity structure of cortical calcium dynamics in anesthetized and awake mice. *PLOS ONE*, 12(10):e0185759, oct. 2017.
- [130] C. WU, A. R. HONARMAND, S. SCHNELL, R. KUHN, S. E. SCHOENEMAN, S. A. ANSARI, J. CARR, M. MARKL et A. SHAIBANI : Age-related changes of normal cerebral and cardiac blood flow in children and adults aged 7 months to 61 years. *Journal of the American Heart Association*, 5(1):e002657, jan. 2016.
- [131] B. XIONG, A. LI, Y. LOU, S. CHEN, B. LONG, J. PENG, Z. YANG, T. XU, X. YANG, X. LI, T. JIANG, Q. LUO et H. GONG : Precise cerebral vascular atlas in stereotaxic coordinates of whole mouse brain. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11:128, déc. 2017.
- [132] Z. YANG, R. C. CRADDOCK et M. P. MILHAM : Impact of hematocrit on measurements of the intrinsic brain. *Frontiers in Neuroscience*, 8, jan. 2015.
- [133] F. ZAMANI ESFAHLANI, Y. JO, J. FASKOWITZ, L. BYRGE, D. P. KENNEDY, O. SPORNS et R. F. BETZEL : High-amplitude co-fluctuations in cortical activity drive functional connectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(45):28393–28401, oct. 2020.
- [134] P. ZATKA-HAAS, N. A. STEINMETZ, M. CARANDINI et K. D. HARRIS : Sensory coding and the causal impact of mouse cortex in a visual decision. *eLife*, 10:e63163, july 2021.
- [135] B. ZINGG, H. HINTIRYAN, L. GOU, M. SONG, M. BAY, M. BIENKOWSKI, N. FOSTER, S. YAMASHITA, I. BOWMAN, A. TOGA et H.-W. DONG : Neural networks of the mouse neocortex. *Cell*, 156(5):1096–1111, fév. 2014.

Annexe A

Méthode de traitement des artefacts de mouvement

A.1 Obstacles à la correction du mouvement

Dans ce mémoire, nous avons parlé à plusieurs reprises de l'importance de corriger les données neuronales afin de retirer autant que possible les artefacts qui le contaminent. Au vu des comparaisons entre les souris transgéniques et les souris *wildtype*, on constate que le signal que nous avons utilisé pour l'analyse n'est pas parfait et qu'il aurait pu être corrigé davantage. Cet annexe contient un bref aperçu d'une méthode de correction du mouvement qui a été mise en place, mais qui n'a pas été utilisée sur les données finales

Souvent, les souris fixées au système d'imagerie bougent en de très courts sursauts. Ces mouvements soudains créent de grands pics de mouvement qui sont visible simultanément dans le signal neuronal et dans le signal vasculaire. Le problème avec l'identification des pics de mouvement est qu'il est difficile de s'assurer qu'il s'agit bel et bien d'un mouvement de la souris, et pas simplement d'un pic d'activité réel dans les données corticales. Comme montré à la figure 2.3, le décalage entre le signal neuronal et le signal vasculaire est souvent proche de zéro, donc il est difficile de départager un pic de mouvement d'un pic d'activité.

Une manière d'y parvenir est de regarder l'extérieur de la fenêtre corticale. En théorie, puisqu'on ne voit pas de tissu cortical à l'extérieur de la fenêtre crânienne, tout le signal qui y est mesuré devrait correspondre à du bruit, des artefacts de mouvement, et potentiellement une certaine part de lumière réfléchi diffusée par les poils. En moyennant le signal qui se trouve à l'extérieur de la région d'intérêt, on devrait donc être en mesure de détecter les pics de mouvement. Une comparaison du signal neuronal, vasculaire et de la série temporelle de l'extérieur de la fenêtre, correspondant théoriquement au mouvement, se trouve à la figure A.1. Comme on peut le constater, on observe des pics approximativement simultanés dans les trois séries temporelles.

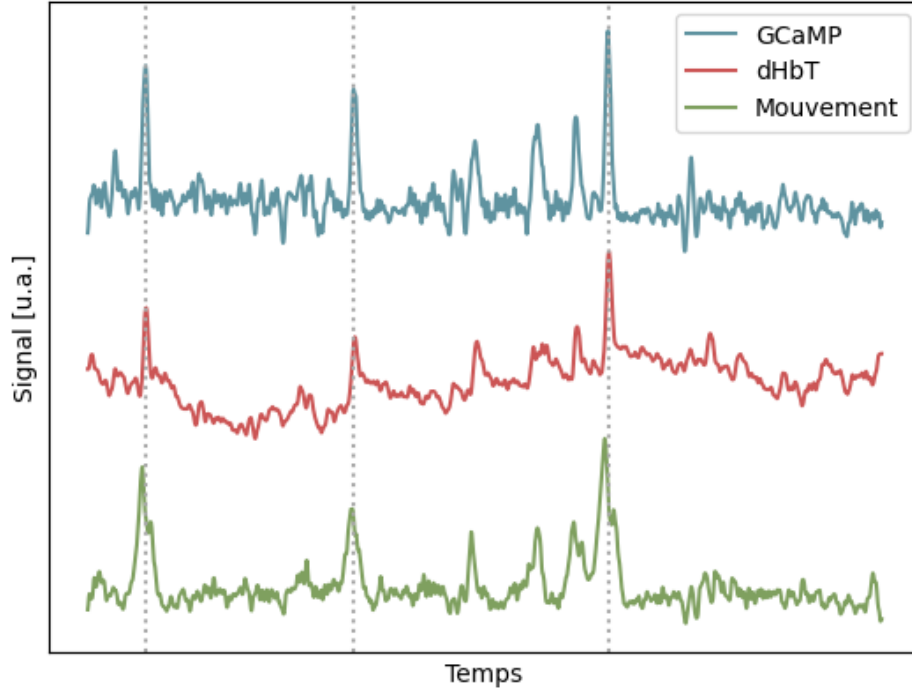


FIGURE A.1 – Signaux neuronal (GCaMP), vasculaire (dHbT) et de mouvement (extérieur de la fenêtre)

Il y a toutefois un hic avec cette méthode de détection des pics de mouvement : il est impossible d'être certain qu'un pic de mouvement, aussi réel qu'il soit, ne coïncide pas avec un pic d'activité corticale tout aussi réel. Après tout, il est fort possible que ce soit un pic d'activité cérébrale qui ait déclenché le mouvement de la souris. Par exemple, il est possible que les régions motrice et somatosensorielle se soient activées peu avant le mouvement et que ce soit cette activité qui ait déclenché le mouvement. Ou à l'inverse, peut-être que le mouvement de la souris a fait en sorte que ses vibrisses ont perçu un stimulus et que les zones sensorielles se sont activées en réponse. Bref, même si nous nous assurons qu'un pic de mouvement en est bien un, rien ne nous assure que de le corriger n'affectera pas les données corticales de manière imprévue.

A.2 Méthode de correction du mouvement

Une méthode a tout de même été implémentée afin d'effectuer une correction sommaire des pics de mouvement. Elle se base sur une procédure simple de régression linéaire afin de retirer l'influence des pics de mouvement pixel par pixel dans la zone d'imagerie.

Soit un signal $y(t)$ contaminé par un signal de mouvement $x(t)$. Le signal $y(t)$ peut être exprimé comme

$$y(t) = a \cdot x(t) + \epsilon(t)$$

où a est la pente de la régression (l'intensité du signal de mouvement) et $\epsilon(t)$ correspond au résidu, soit la partie du signal qui n'est pas due au mouvement. C'est cette partie qu'on cherche à isoler car c'est elle qui contient l'information qui n'est pas reliée au mouvement. On cherche donc

$$\epsilon(t) = y(t) - a \cdot x(t).$$

La procédure est donc la suivante : pour chaque pixel de la zone d'imagerie, une régression linéaire est faite entre le signal bruité (brut, contaminé par le mouvement) et le signal correspondant au mouvement obtenu en moyennant l'extérieur de la fenêtre corticale. Le signal « nettoyé » est obtenu indépendamment pour chaque pixel en soustrayant le signal de mouvement multiplié par la pente de la régression au signal brut. En code Python, la procédure se traduit ainsi :

```
regression = scipy.stats.linregress(mouvement, signal_brut)
signal_propre = signal_brut - mouvement * regression.slope
```

Un exemple plus complet est donné dans le fichier `example_mouvement_correction.ipynb`, disponible sur *GitHub* à l'adresse https://github.com/Jordan-Charest/MICHElab_GUI.git.

Cette méthode a été testée sur nos données. Au final, nous avons choisi de ne pas l'employer pour nos analyses, car les résultats n'étaient pas concluants. Le signal de mouvement obtenu avec l'extérieur de la fenêtre d'imagerie est lui-même bruité, donc la régression ne fonctionne pas toujours de manière adéquate. Pour cette raison en plus de celles exposées à la section précédente, nous avons choisi de ne pas utiliser la correction du mouvement afin de ne pas altérer les données corticales d'une manière qui n'était ni concluante ni facilement interprétable.

Annexe B

Processus de traitement de données

Note : le code auquel cette annexe réfère est disponible sur *GitHub* à l'adresse https://github.com/Jordan-Charest/MICHElab_GUI.git.

Les données brutes reçues (imagerie calcique, IOI, vidéo de surveillance) ont subi soit aucun traitement préliminaire, soit un traitement de base. Afin que les données soient appropriées pour les calculs, plusieurs opérations doivent y être appliquées au préalable.

De nombreux scripts Python disponibles au lien ci-haut ont été écrits pour que ces opérations s'effectuent de la manière la plus simple possible, mais requièrent une certaine mise en place pour fonctionner. Voici une marche à suivre sommaire qui explique chacune des étapes devant être faite afin d'effectuer le prétraitement des données ; les noms de fichiers donnés ici sont ceux correspondant à ceux obtenus du *pipeline* d'imagerie du laboratoire de Michèle Desjardins, mais les noms peuvent être changés dans les scripts au besoin.

1. Organiser les données brutes selon la structure de fichiers. Notamment, les fichiers `dHb0.tif`, `dHbR.tif`, `dHbT.tif`, `GCaMP.tif`, `rawdata_green.tif`, ainsi que la vidéo de surveillance (typiquement `RS_mouse#_video.mp4` ou similaire) doivent être placés dans un même dossier.

2. Ajouter les informations de la souris au fichier `data.txt`. Les champs par défaut sont l'âge en mois (arrondi au mois le plus proche), le sexe, le numéro de cohorte, et l'identifiant GCaMP (`True` si la souris est transgénique, `False` s'il s'agit d'une souris *wildtype*). D'autres champs peuvent être ajoutés si désiré. Toutes les informations contenues dans `data.txt` seront sauvegardées automatiquement comme métadonnées (*attributes*) du groupe `data` dans le fichier HDF5 à l'étape 9.

3. S'assurer que les noms de fichiers concordent avec la nomenclature existante. Les scripts utilisés pour le traitement de données se basent sur le chemin d'accès et les noms de fichiers afin d'accéder aux bonnes données. Il est donc nécessaire que les noms de fichiers soient cohérents entre eux. Au besoin, modifier les chemins d'accès dans les scripts Python.

4. Générer une image moyenne de données brutes du canal vert. Cette image peut être obtenue en moyennant sur le temps (axe 0 par défaut) le fichier `rawdata_green.tif`. Le canal vert est spécifiquement utilisé car il présente le meilleur contraste entre les vaisseaux sanguins et le reste de la région d'intérêt, ce qui permet de l'utiliser comme référence pour calculer les masques vasculaires et pour tracer la région d'intérêt (voir l'étape 10).

5. Au besoin, réduire la taille des données brutes. Les données brutes ont typiquement une taille de 500 à 650 pixels de hauteur et de largeur, et d'environ 1,2 à 1,8 gigaoctets de taille. Si nécessaire, elles peuvent subir une parcellation en groupes de 2×2 pixels pour en réduire la taille.

Les étapes 4 et 5 peuvent être effectuées simultanément avec le script `bin_and_average.py`. La taille de la parcellation doit être spécifiée, ainsi que les chemins d'accès vers les données brutes et les numéros des souris qui doivent être traitées. Puisque le script remplace directement les données d'entrée, une attention particulière doit être portée à lancer le script sur une copie plutôt que sur les données d'origines, ainsi qu'à ne pas exécuter le script plusieurs fois sur les mêmes données (ce qui appliquerait la parcellation plusieurs fois).

6. Découper la vidéo de surveillance et calculer le mouvement orofacial. Le mouvement orofacial, qui correspond au mouvement de la zone faciale et des moustaches de la souris, peut être calculé à partir de la vidéo de surveillance. Il n'a pas été utilisé dans le présent document mais peut agir comme mesure des mouvements de la souris si désiré.

De plus, la vidéo de surveillance est capturée avant, pendant et après l'imagerie des signaux corticaux, ainsi qu'à une fréquence d'échantillonnage différente. Il est donc nécessaire de découper la vidéo pour qu'elle commence et se termine simultanément aux signaux corticaux, ainsi qu'effectuer une interpolation pour que la fréquence des images soit la même.

Les deux étapes peuvent être réalisées à partir du script `face_motion_and_trimming.py`. Dans la première fenêtre s'ouvrant (calcul du mouvement orofacial), sélectionner la zone faciale de la souris. Dans la seconde fenêtre (découpage et interpolation de la vidéo), sélectionner la première et la dernière image où la lumière au-dessus de la tête de la souris est visible. Le curseur glissant ainsi que les flèches du clavier peuvent être utilisées pour sélectionner les images.

Les indices des images de début et de fin seront sauvegardées dans le fichier `data.txt` sous la ligne *monitoring range* pour éviter d'avoir à refaire la procédure. Le mouvement orofacial sera sauvegardé au format `.npy` et le vidéo coupé et interpolé sera sauvegardé avec le suffixe `_trimmed`.

7. Calculer l'aire de la pupille (pupillométrie). Ce calcul est fait avec le logiciel `facemap`, qui est disponible en ligne ainsi que sa documentation [115, 119]. Une fois la vidéo de surveillance chargée dans l'interface graphique une *pupil ROI* peut être ajoutée autour de l'œil

de la souris dans la fenêtre de gauche. Dans la fenêtre de droite, des réflecteurs doivent être ajoutées pour cacher les réflexions sur la surface de l'œil, et le contraste doit être ajusté jusqu'à ne voir que la pupille.

Une fois l'ajustement fait, le bouton *process* permet de calculer l'aire de la pupille et la case *pupil0* permet d'afficher la série temporelle. Il est nécessaire de valider que le calcul de la pupillométrie s'est effectué correctement car certaines erreurs peuvent survenir, notamment en raison de réflexions, du mouvement de la souris ou du positionnement de la pupille. Il est parfois nécessaire d'ajuster les paramètres et de lancer le calcul plusieurs fois avant d'obtenir une pupillométrie acceptable.

Le fichier de sortie est par défaut sauvegardé avec le suffixe `_proc.npy` dans le même dossier que la vidéo utilisée en entrée. Il doit être déplacé dans le dossier contenant les données brutes au besoin.

8. Effectuer le co-enregistrement de l'atlas sur la fenêtre crânienne. L'atlas du *Allen Institute* [125] est typiquement utilisé afin d'associer chacun des pixels à une région fonctionnelle. Le co-enregistrement peut être effectué avec le script `registration.py`. Le chemin d'accès vers le masque de régions à utiliser, au format `.npy`, doit être indiqué comme paramètre et le script doit être lancé avec les numéros de souris à traiter. Une fenêtre s'ouvrira pour permettre de positionner le masque sur la fenêtre crânienne. Appuyer sur Entrée une fois le recalage terminé sauvegarde l'atlas sous `atlas.npy` et les paramètres de transformation (échelle, position x et y, angle) sous `atlas_params.pkl` pour permettre de refaire la transformation automatiquement sans avoir à positionner manuellement de nouveau.

9. Générer un fichier HDF5 pour la souris contenant toutes les données. Ceci permet de rassembler toutes les données relatives à une souris sous un même fichier HDF5, ce qui permet son utilisation avec l'interface graphique (annexe C). Le script `generate_HDF5_dataset.py` peut être utilisé en y indiquant les données à y inclure ainsi que divers paramètres.

10. Effectuer le traitement des données sur le fichier HDF5. Par exemple l'application de filtres (lissage gaussien, filtres fréquentiels), de masques vasculaires, de normalisation, de sélection de la région d'intérêt, etc. L'interface graphique (`MICHELab_GUI`) peut être utilisée pour tester divers paramètres et opérations de manière exploratoire et permet de visualiser les transformations sur les données. Une fois les opérations et les paramètres déterminés, ils peuvent être appliqués sur plusieurs jeux de données à la fois à l'aide du script `batch_processing.py` et d'un fichier d'instructions se trouvant dans le dossier `batch_processing_instructions`. Une brève description de ce processus est donnée à l'annexe C.

Annexe C

Interface graphique

Afin d'effectuer l'exploration des données, leur stockage et leur traitement, une interface graphique a été développée au cours de ce projet à l'aide de la librairie `tkinter` de Python. Cet annexe contient un bref aperçu des fonctionnalités que l'interface offre, et le code complet est disponible sur *GitHub* à l'adresse https://github.com/Jordan-Charest/MICHElab_GUI.git.

Tel que mentionné en avant-propos, des outils d'intelligence artificielle générative ont été utilisés afin de mettre en place le code utilisant la librairie `tkinter` ainsi que certaines des fonctions de visualisation des données. Cependant, les fonctions d'analyse et de transformation des données ont été codées manuellement et testées rigoureusement avant leur ajout dans l'interface graphique.

C.1 Aperçu d'ensemble

L'interface graphique utilise majoritairement des fichiers au format HDF5 (`.h5`) afin de stocker et traiter les données. Trois raisons majeures motivent ce choix :

1. La structure des fichiers HDF5, semblable à des dictionnaires Python imbriqués, permet de consolider plusieurs jeux de données dans un seul fichier et d'y accéder facilement. Ainsi, toutes les données relatives à une souris (signal neuronal, signal vasculaire, diamètre de pupille, atlas des régions corticales, etc.) peuvent être stockées dans un seul fichier.
2. Les fichiers HDF5 supportent les métadonnées, nommées *attributes*. Celles-ci permettent de stocker des informations importantes par rapport aux données, par exemple le sexe et l'âge de la souris, son identifiant, ou encore les paramètres avec lesquels les données ont été traitées.
3. Les fichiers HDF5 supportent le *lazy loading*, c'est-à-dire qu'il est possible de charger en mémoire une seule partie du fichier à la fois, contrairement à d'autres formats comme

les fichiers *NumPy* (`.npy`). Pour des jeux de données volumineux comme ceux qui sont utilisés ici, cela facilite le traitement des données en réduisant la mémoire vive nécessaire.

L'interface graphique possède six onglets :

- **Create HDF5** permet de consolider plusieurs fichiers au format `.npy` ou `.tiff` ensemble dans un seul fichier `.h5`, de spécifier la structure désirée et d'ajouter des métadonnées (*attributes*). Une version automatisée de cette fonction est contenue dans le script indépendant `generate_HDF5_dataset.py`.
- **HDF5 processing** permet d'explorer des fichiers HDF5 existants, de visualiser les données et d'en faire le traitement.
- **Compute dim. red** permet d'effectuer une réduction dimensionnelle d'un jeu de données. À partir de fichiers d'entrée sélectionnés, une réduction dimensionnelle peut être lancée avec l'algorithme UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) ou par une analyse par composantes principales (PCA).
- **Preview dim. red** permet de visualiser une réduction dimensionnelle déjà sauvegardée, et de projeter dans cet espace un jeu de données. Il permet aussi de déterminer les *loadings* d'une réduction dimensionnelle.
- **Compute dFC** permet de sauvegarder des matrices de connectivité fonctionnelle dynamique selon la procédure qui est détaillée à la section 2.2.2.
- **Comm. detect** permet d'effectuer une détection de communautés sur des matrices de connectivité fonctionnelle. Pour le moment, l'interface supporte la méthode de Louvain et l'algorithme *k-means*.

En plus des fonctionnalités de ces onglets, l'interface possède un menu dans le coin supérieur droit contenant trois boutons :

- **Show Log** permet de faire apparaître une fenêtre où les *logs*, fonctions *print* et erreurs rencontrées lors de l'exécution s'affichent.
- **Reload Tabs** permet de re-charger dynamiquement l'interface graphique et de réinitialiser son état. Appuyer sur ce bouton met aussi à jour le code, ce qui permet d'effectuer le développement de l'interface et de la mettre à jour dynamiquement sans avoir à la fermer et relancer.
- **Help** fait apparaître une fenêtre d'aide. Celle-ci affiche une explication de l'onglet actif et de ses principales fonctionnalités.

L'interface a été conçue pour être modulaire, c'est-à-dire que de nouvelles fonctionnalités et de nouveaux onglets peuvent être ajoutés aisément en suivant la structure de code déjà existante. Il suffit de créer un nouveau script Python associé à l'onglet qui doit être ajouté, puis de l'importer dans le script principal de l'interface.

C.2 *HDF5 Processing*

L'onglet *HDF5 Processing* comporte un nombre particulièrement élevé de fonctionnalités. Un usage extensif en a été fait lors de ce projet.

La partie supérieure de l'onglet est dédiée à l'exploration de fichiers HDF5. Une fois le fichier sélectionné, les jeux de données qu'il contient ainsi que leurs chemins d'accès s'affichent à la gauche de l'interface et l'utilisateur peut en sélectionner un ou plusieurs. À droite de l'interface, les métadonnées associées au dernier jeu de données sélectionné s'affichent.

La seconde partie de l'onglet est dédiée aux scripts de traitement de données. Un total de 14 opérations sont implémentées au moment d'écrire ce document, passant par des opérations simples comme un *z-score*, un filtrage fréquentiel ou gaussien, jusqu'à des opérations plus complexes comme la sélection de régions d'intérêt avec le logiciel *FIJI* (lancé automatiquement à partir d'une installation portable) ou le co-enregistrement des régions corticales. L'utilisateur peut choisir plusieurs opérations à effectuer, et celles-ci sont appliquées séquentiellement dans l'ordre spécifié.

À chaque étape, des fenêtres interactives peuvent apparaître pour que l'utilisateur puisse tester différents paramètres et en visualiser l'effet avant de finalement lancer l'opération avec les paramètres choisis. Ceci permet de tester une variété de paramètres de traitement de données sans avoir à générer de multiples versions des jeux de données.

La dernière partie de l'onglet est dédiée à la visualisation des données. Les divers boutons qui s'y trouvent permettent de visualiser des données 1D, 2D et 3D, d'en faire la *Seed Based Correlation*, et d'en visualiser le spectre de densité de puissance.

Tout comme l'interface dans son entièreté, cet onglet a été conçu pour être modulaire. De nouvelles opérations peuvent être ajoutées simplement en suivant le format déjà existant et en glissant le script dans le dossier approprié.

C.3 Traitement de données en lot

L'interface graphique permet de tester les opérations appliquées à chaque étape, de visualiser leur effet sur les données et ainsi de déterminer les meilleurs paramètres, mais une fois que les paramètres finaux ont été déterminés il s'agit d'une façon plutôt lente de traiter un grand nombre de souris.

Pour remédier à ce problème, l'utilisateur peut faire usage du script `batch_processing.py`. Celui-ci peut être lancé depuis le terminal en spécifiant les identifiants de toutes les souris à traiter ainsi qu'un fichier contenant les instructions de traitement, contenu dans le dossier `batch_instructions`. Les opérations indiquées dans ce fichier seront suivies séquentiellement avec les paramètres spécifiés une souris à la fois sans requérir d'intervention de l'utilisateur

(sauf dans certains cas spécifiques, par exemple pour sélectionner manuellement la région d'intérêt si elle n'a pas été sauvegardée auparavant).

Annexe D

Souris imagées

Le tableau D.1 ci-dessous répertorie les souris qui ont été imagées et dont les données ont été utilisées dans le cadre de ce projet. La réalisation de l'imagerie a été faite par Alexandre Cléroux Cuillerier, qui a accepté de partager les données recueillies.

TABLE D.1 – Souris utilisées dans le cadre de ce projet.

Identifiant	Sexe	Gène GCaMP	Âges disponibles
316	F	Oui	8, 10, 12, 14, 16
322	M	Oui	6, 8, 10, 12, 14
353	M	Oui	6, 8, 10, 12, 14
361	F	Oui	6
365	F	Oui	6
367	F	Oui	6
374	M	Oui	6, 8, 10
387	M	Oui	6, 10, 12
396	F	Oui	6
397	F	Oui	6
410	M	Oui	6, 8, 10, 12, 14
412	F	Oui	8, 10, 12
415	F	Oui	6, 8
39	F	Non	12
42	F	Non	12
44	M	Non	12
45	M	Non	12
46	M	Non	12
251	F	Non	6
254	M	Non	6
308	F	Non	8, 10, 12, 14, 16