



**HAL**  
open science

# Automatisation et optimisation de l'analyse d'images anatomo-fonctionnelles de cerveaux de souris par atlas numérique 3D

Jessica Lebenberg

► **To cite this version:**

Jessica Lebenberg. Automatisation et optimisation de l'analyse d'images anatomo-fonctionnelles de cerveaux de souris par atlas numérique 3D. Interface homme-machine [cs.HC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2010. Français. NNT : . tel-00611488

**HAL Id: tel-00611488**

**<https://theses.hal.science/tel-00611488v1>**

Submitted on 26 Jul 2011

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

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

N° D'ORDRE : 10141



## THÈSE DE DOCTORAT

SPÉCIALITÉ : PHYSIQUE

*École Doctorale "Sciences et Technologies de l'Information des Télécommunications et des Systèmes"*

Présentée par : **Jessica LEBENBERG**

Sujet :

**AUTOMATISATION ET OPTIMISATION DE L'ANALYSE D'IMAGES ANATOMO-FONCTIONNELLES DE CERVEAUX DE SOURIS PAR ATLAS NUMÉRIQUE 3D**

Soutenue publiquement le **14 décembre 2010** devant le jury composé de :

Mme Irène BUVAT  
M. Thierry DELZESCAUX  
M. Philippe HANTRAYE  
M. Fabrice HEITZ  
M. Grégoire MALANDAIN  
M. Jean-Marie ROCCHISANI

Présidente du jury  
Encadrant de thèse  
Directeur de thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur



*A ma famille*

*A mes amis*

*A Elisa*

*A Augustin*



# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier M<sup>me</sup> Irène Buvat, qui a accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'en être la présidente ainsi que MM. Fabrice Heitz et Grégoire Malandain, qui ont accepté la charge de rapporteur. Je les remercie de leur lecture attentive de mon manuscrit et de leurs commentaires pertinents sur mon travail de recherche. Je remercie également M. Jean-Marie Rocchisani de sa participation enrichissante lors de ma soutenance de thèse.

Ce travail de recherche n'aurait pu avoir lieu sans le soutien de M. Philippe Hantraye, mon directeur de thèse et également directeur du centre de recherche MIRCen. Je le remercie de son accueil au sein du laboratoire ainsi que de ses remarques et conseils de "biologiste" dont il m'a fait part tout au long de ma thèse.

Enfin, je tiens à remercier M. Thierry Delzescaux, qui a encadré mes travaux de recherche et auprès de qui j'ai trouvé le soutien dont j'avais besoin en ces périodes particulières que sont la rédaction du manuscrit et la préparation de la soutenance de thèse. Sa créativité scientifique, son intégrité ainsi que sa persévérance m'ont aidée à m'épanouir dans mon travail et je l'en remercie infiniment. J'espère avoir été à ses yeux à la hauteur, et plus encore, de ce qu'il attendait pour mener ces travaux.

J'aimerais une fois encore remercier toutes ces personnes pour leurs interventions instructives lors de ma soutenance de thèse. J'ai été honorée de participer à une telle discussion scientifique avec elles.

Ces travaux de thèse ont pu être menés grâce à l'aide et aux soutiens scientifiques et moraux d'un grand nombre de personnes, notamment de :

L'équipe BioPICSEL (ou PANINI pour les intimes !) au grand complet.

Je tiens vraiment à remercier Anne-Sophie Hérard pour toutes les notions de biologie qu'elle a pu m'apprendre au cours de ces trois ans et pour ces heures passées à segmenter des demis-cerveaux de souris, à regarder des pixels se battre en duel pour savoir à quelle structure ils pouvaient bien appartenir ou à relire mes publications et manuscrit même entre les biberons. Je voudrai aussi la remercier pour sa grande disponibilité, son dévouement, son écoute et la confiance qu'elle m'a accordée. La vie de l'équipe n'est plus la même sans elle, son franc-parler et son thé à la menthe (et ses cours de loucherbem!). Bienvenue à ta petite Lou et bon retour à toi dans l'équipe. J'espère qu'on aura plus d'une occasion pour se revoir.

Je voudrai également remercier Julien Dauguet pour ses explications mathématiques de nombreux problèmes, les conseils avisés qu'il m'a apportés tout au long de ma thèse et ses relectures. Je le remercie aussi pour ses discussions musicales qui ont pu certes ennuyer les autres mais qui moi m'ont beaucoup intéressée. Et qui sait, un jour on jouera peut-être ensemble ?

Un très grand merci évidemment à Nicolas Souedet grâce à qui les codes finissent toujours par compiler. Les bugs de BrainVISA et d'Anatomist n'ont qu'à bien se tenir avec lui ! Merci aussi pour tous les "soleils" qu'il apporte au quotidien et son humour décalé qui ne peut mettre qu'une bonne ambiance lors des pauses café. Bienvenue aussi à ta petite Eloïse.

Et bien sûr, je n'oublie pas tous les stagiaires qui ont participé à la vie de l'équipe, notamment Jean-Luc Lor qui, malgré quelques unes de ses blagues vaseuses (je n'oublie pas le coup du tableau blanc devant la porte ni celui des post-it!) et sa tenue parfois surprenante (non non non, on ne vient pas en tongues en plastique au labo, même si le bureau est inondé...), a toujours été d'un soutien irréprochable durant son stage et même après. J'espère que ton expérience londonienne sera enrichissante et te plaira. Mais je n'oublie pas non plus Blandine Romain, Anton Moukharski, Guillaume Campeggi, Olivier Fremont et Zo Randrianarivo. J'ai été ravie de partager le bureau avec vous durant quelques mois. Je m'excuse pour mon mutisme qui a peut-être été pesant ces derniers temps. En temps normal, je suis beaucoup plus loquace, si si je vous le promets ! Bonne continuation à vous.

Je souhaite également remercier Marc Dhenain pour son implication dans mon projet de thèse et ses corrections d'articles et de manuscrit judicieuses. Son point de vue de biologiste m'a aidée à mieux appréhender le sujet et je l'en remercie beaucoup.

Je remercie aussi grandement Albertine Dubois qui m'a chaleureusement accueillie au SHFJ et présentée à de nombreuses personnes. Grâce à elle, la prise en main de nombreux logiciels essentiels à la vie des doctorants (BrainVISA, Kile, Inkscape...) a été beaucoup plus ludique et efficace. Je la remercie aussi pour avoir abordé avec Thierry, au temps où il était son encadrant, certains sujets épineux comme le choix de la couleur de la couverture du manuscrit. J'ai pu ainsi imposer ma "girly touch" presque sans embuche.

Merci à l'ensemble de l'URA 2210 : Emmanuel Brouillet et Nicole Deglon pour leurs remarques avisées lors de mes présentations, et Gilles Bonvento, Carole Escartin, Vincent Lebon, Julien Valette, Nadja Van Camp, Yann Bramouille, Sonia Lavisce, Caroline Jan, Sabrina Boulet, Elsa Diguët, Martine Guillermier, Fanny Petit, Emmanuel Bourrin et tous les autres membres de MIRCen pour leur bonne humeur et leur aide ponctuelle qui m'ont permis d'appréhender de façon plus sereine quelques périodes difficiles. Je remercie particulièrement Nelly Joseph-Mathurin, Olène Dorieux, Charlotte Marchadour, Charlène Joséphine et Mathieu Santin pour leur enthousiasme et leur soutien. J'attends avec impatience notre prochaine soirée au Bistrot des Artistes (ou ailleurs, tant que le mojito est au rendez-vous!). Je souhaite à tous les doctorants de MIRCen beaucoup de courage et n'oubliez pas, au final, ça va bien se passer!

Un grand merci également à Denis Rivière et Yann Cointepas pour leurs aide et disponibilité lorsque j'ai eu quelques interrogations sur Anatomist et BrainVISA. Je remercie également Vincent Frouin pour sa grande contribution à mes premiers travaux. Et quelque chose me dit que la collaboration "Frouin-Lebenberg" va continuer!

Je remercie également Didier Thenadey, Rozenn Rougetet et Frédérique Napoléone pour leur entrain et leur efficacité exceptionnelle en toute circonstance. Un grand bravo à Buzz l'éclair pour sa gestion de l'inondation inopinée de la salle des serveurs : à peine quelques heures sans réseau et hop, tout était reparti!

Merci aussi à Marie-Laure Manenti et Maryse Mouveroux pour m'avoir aidée à venir à bout de toutes les démarches administratives.

Je remercie aussi tous les SHFJistes qui ont rendu mon début de thèse souriant et encourageant. Je remercie particulièrement Sébastien Jan pour son humour décalé qui m'a fait tellement rire et ses conseils en traitement d'images ainsi qu'Elodie Dusch sans qui ma vie aujourd'hui ne serait pas la même. On programme bientôt une soirée tarot? Merci aussi pour les "coups de stress" que tu as pu me donner et qui m'ont permis de tout faire pour

me surpasser. Merci aussi à tous les gens avec qui j'ai partagé de très bons moments en B114, notamment Luc Saint-Christophe et Florent Sureau pour leur aide en C++ ou en Linux, mais aussi Paolo Zanotti et Emilia Becheva pour leur gentillesse sans faille. Merci aussi à Yoann Fontyn, Pascal Merceron, Vincent Brulon et Renaud Maroy pour les pauses café et autres bons moments passés à Orsay.

Un très grand merci à mes compagnons de congrès : Aurélie Verpilleux, Myriam Chaumeil, Fawzi Boumezbeur, Sébastien Mériaux, Julien Dauguet et Thierry Delzescaux. J'ai découvert avec eux de superbes endroits dans des coins du monde où je n'aurais jamais pensé aller. Je n'oublierai pas les brunch à volonté en bord de plage ni la séance de snorkeling une heure avant la présentation de mon premier poster !

Je ne serais jamais arrivée au bout de cette expérience sans le soutien inconditionnel de mes amis rencontrés en cours, en colo, à l'orchestre ou ailleurs. Depuis presque 20 ans pour certains d'entre-vous, "la main dans la main, en cercle enlacé", je construis ma vie avec et grâce vous. Vous avez toujours été là dans les moments importants. "Il paraît qu'on peut connaître quelqu'un à ses copains, et j'ai de la chance, parce que les miens sont très très biens !"

Je remercie évidemment ma famille (la *michpoukè* au grand complet !) et surtout mes parents pour m'avoir fait grandir dans un environnement où j'ai beaucoup appris (merci Corvol !). Je remercie mes grands-mères, ma sœur Déborah et mon frère Jonathan, Éric et Pauline. Vous tous m'avez toujours guidée et soutenue pour chacun de mes choix et j'en suis plus que reconnaissante. Ce travail est aussi un peu le votre et je suis sûre que ma tante en aurait été fière. Un merci particulier à ma nièce chérie, Elisa. Tu égaies nos vies depuis 6 mois et maintenant que je suis plus disponible, je vais enfin pouvoir t'apprendre quelques tours à ma façon !

Mes derniers remerciements reviennent à toi, Augustin. Qui l'eut cru qu'une soirée tarot changerait nos vies ! Grâce à ta gentillesse et ton soutien quotidien, ton humour un peu décalé (petit à petit je me geekise et un jour, promis, je comprendrai tout !), mais aussi grâce aux matinées Friends et France Inter et à tes bonnes ondes transmises par ton aloé vera, j'ai pu surmonter les moments difficiles de cette thèse. L'épreuve s'est finie dans la bonne humeur grâce à toi ; une nouvelle année commence et je suis sûre qu'elle sera à l'image de ces premières journées ensoleillées de l'année que nous avons passées.

# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>i</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Analyse d'images en recherche pré-clinique</b>	<b>4</b>
1.1 Recherche pré-clinique . . . . .	5
1.1.1 Un modèle animal de prédilection, la Souris . . . . .	5
1.1.2 Modélisation de la maladie d'Alzheimer sur la Souris . . . . .	6
1.2 L'imagerie, outil d'investigation incontournable . . . . .	9
1.2.1 Imagerie <i>post mortem</i> . . . . .	9
1.2.2 Imagerie <i>in vivo</i> . . . . .	15
1.2.3 Complémentarité des modalités d'imagerie . . . . .	21
1.3 Mise en correspondance d'images . . . . .	23
1.3.1 Recalage d'images . . . . .	23
1.3.2 Repères pour apparier les images . . . . .	24
1.3.3 Recalage par approches globales, locales, pyramidales et multi-échelles	26
1.3.4 Classes de transformations . . . . .	27
1.3.5 Optimisation . . . . .	30
1.3.6 Évaluation du recalage . . . . .	34
1.4 Méthodes d'analyse d'images 2D acquises <i>post mortem</i> . . . . .	38
1.4.1 Approche classique d'analyse d'images 2D <i>post mortem</i> . . . . .	38
1.4.2 Analyse semi-automatique . . . . .	40
1.5 Méthodes d'analyse d'images 3D acquises <i>post mortem</i> . . . . .	44
1.5.1 Reconstruction 3D de données acquises <i>post mortem</i> . . . . .	44

1.5.2	Analyse par comparaison statistique des intensités des pixels . . . . .	47
1.5.3	Analyse par atlas numérique 3D . . . . .	52
1.6	Problématique du projet de thèse : analyse par atlas de données <i>post mortem</i> reconstruites en 3D . . . . .	60
<b>2</b>	<b>Atlas numériques utilisés et données expérimentales étudiées</b>	<b>63</b>
2.1	Atlas numériques 3D de cerveau de souris . . . . .	64
2.1.1	Atlas créé par le LONI . . . . .	64
2.1.2	Atlas créé par le CIVM . . . . .	67
2.2	Données expérimentales de l'étude préliminaire sur la maladie d'Alzheimer	71
2.2.1	Animaux étudiés . . . . .	71
2.2.2	Acquisition de données <i>post mortem</i> . . . . .	71
2.2.3	Reconstruction tridimensionnelle des données de l'étude . . . . .	73
<b>3</b>	<b>Recalage d'un atlas numérique sur des volumes <i>post mortem</i> et analyse des données</b>	<b>78</b>
3.1	Stratégie de recalage d'un atlas numérique sur des images 3D de cerveaux de souris acquises <i>post mortem</i> . . . . .	79
3.1.1	Traitements préliminaires de l'atlas . . . . .	79
3.1.2	Méthodologie de recalage développée . . . . .	83
3.1.3	Critères d'évaluation qualitative et quantitative de la méthode de recalage . . . . .	87
3.2	Etude de faisabilité de la méthode de recalage . . . . .	91
3.2.1	Evaluation des étapes du recalage . . . . .	91
3.2.2	Validation du choix de la modalité de référence utilisée pour le recalage	97
3.2.3	Discussion sur la stratégie de recalage mise en place . . . . .	100
3.3	Sélection de l'atlas numérique 3D pour analyser les données expérimentales	103
3.3.1	Protocole de comparaison des atlas . . . . .	103
3.3.2	Choix de l'atlas pour analyser les données de l'étude . . . . .	106
3.4	Analyse par atlas de volumes <i>post mortem</i> anatomiques et fonctionnels . .	109
3.4.1	Recalage de l'atlas sur les données de l'étude . . . . .	109
3.4.2	Étude de groupe à l'échelle des structures cérébrales . . . . .	109
3.4.3	Discussion des résultats obtenus . . . . .	112
3.5	Bilan de l'approche d'analyse par atlas des images <i>post mortem</i> 3D et valorisation des travaux . . . . .	114

<b>4</b>	<b>Supervision par atlas de l'analyse statistique des intensités des pixels</b>	<b>116</b>
4.1	Analyse fonctionnelle par comparaison statistique des intensités des pixels des volumes autoradiographiques . . . . .	117
4.1.1	Normalisation des images fonctionnelles dans un référentiel commun	117
4.1.2	Étude statistique de groupes . . . . .	121
4.1.3	Discussion des résultats de l'approche d'analyse par comparaison statistique des intensités des pixels des images . . . . .	126
4.2	Indexation automatique par atlas des zones de variations d'activités cérébrales	129
4.2.1	État de l'art . . . . .	129
4.2.2	Normalisation de l'atlas numérique dans le référentiel des cartes paramétriques . . . . .	131
4.2.3	Indexation automatique des <i>clusters</i> basée sur les segmentations de l'atlas . . . . .	135
4.2.4	Discussion de la méthode et des résultats d'indexation automatique par atlas des <i>clusters</i> représentant les variations d'activité entre les groupes . . . . .	138
4.3	Analyse quantitative de la répartition des <i>clusters</i> dans le cerveau de souris	140
4.3.1	Taux de recouvrement des <i>clusters</i> et des segmentations de l'atlas .	140
4.3.2	Analyse fonctionnelle dans les sous- <i>clusters</i> indexés par l'atlas . . .	143
4.3.3	Discussion de l'analyse quantitative de la répartition des <i>clusters</i> dans le cerveau de souris . . . . .	146
4.4	Utilisation de l'atlas pour restreindre le nombre de tests statistiques effectués	150
4.4.1	Nouveau modèle statistique . . . . .	151
4.4.2	Résultats de cette nouvelle analyse statistique . . . . .	151
4.4.3	Discussion de la méthode de correction de tests statistiques par atlas	152
4.5	Bilan de la combinaison d'approches d'analyse de données <i>post mortem</i> et valorisation des travaux . . . . .	154
<b>5</b>	<b>Utilisation de l'atlas numérique 3D de cerveau de souris pour l'analyse de données acquises <i>in vivo</i></b>	<b>157</b>
5.1	Contexte de l'étude sur la neuroinflammation . . . . .	158
5.1.1	Étude de la neuroinflammation sur la Souris . . . . .	158
5.1.2	Problématique de l'étude . . . . .	159
5.2	Données de l'étude . . . . .	160
5.2.1	Données TEP et TDM . . . . .	160
5.2.2	Atlas numérique utilisé pour cette étude . . . . .	162
5.3	Mise en correspondance de l'atlas numérique sur les données TDM et TEP	163

---

5.3.1	Stratégie de recalage proposée . . . . .	163
5.3.2	Extraction de la surface externe des cerveaux des images et création de la carte des distances . . . . .	164
5.3.3	Estimation et évaluation de la transformation de recalage . . . . .	165
5.4	Discussion des résultats du recalage de l'atlas sur les données TEP et TDM	167
5.4.1	Limitation de la méthode . . . . .	167
5.4.2	Amélioration de la méthode . . . . .	168
5.5	Bilan de l'utilisation d'un atlas en vue d'une analyse de volumes TEP et valorisation des travaux . . . . .	169
<b>Conclusion et perspectives</b>		<b>171</b>
<b>A Recalage par appariement de blocs / Principe du Block Matching</b>		<b>175</b>
<b>B Liste des structures présentes dans l'atlas créé par le LONI</b>		<b>178</b>
<b>C Liste des structures présentes dans l'atlas créé par le CIVM</b>		<b>181</b>
<b>D Homogénéisation de la définition des structures des deux atlas</b>		<b>184</b>
<b>E Publications</b>		<b>186</b>
<b>Références bibliographiques</b>		<b>187</b>

# Introduction

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies qui affectent de façon progressive le système nerveux central. Les dégénérescences impliquées sont liées à un dysfonctionnement métabolique du tissu nerveux conduisant à la mort des neurones et à la destruction du système nerveux.

Certaines de ces maladies, comme la chorée de Huntington, peuvent être symptomatiques chez l'enfant ou le jeune adulte. La majorité de ces pathologies se rencontre néanmoins après 65 ans. La conséquence pour le malade est une atteinte prédominante et progressive, souvent irréversible, des fonctions psychiques aboutissant à la démence comme dans la maladie d'Alzheimer ou des fonctions motrices comme dans la sclérose latérale amyotrophique ou la maladie de Parkinson. Dans certaines pathologies, comme la chorée de Huntington, le dysfonctionnement neuronal concerne les fonctions psychiques et motrices. Malgré les progrès réalisés ces dernières années concernant les causes potentielles, l'évolution et les traitements ralentissant les dégénérescences développées, la plupart de ces maladies neurodégénératives restent incurables et sont souvent létales. La prise en charge des patients étant lourde, de nombreuses conséquences sociales et humaines apparaissent ; ces maladies sont un problème de Santé Publique.

Au sein du centre de recherche du Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), le Laboratoire des Maladies Neurodégénératives est en charge de développer une recherche fondamentale et pré-clinique sur ces maladies. Ce laboratoire est rattaché à la plateforme d'imagerie biomédicale MIR Cen<sup>a</sup>, centre de recherche translationnelle. La mission de ce centre est de proposer des stratégies thérapeutiques innovantes, développées et validées sur des modèles animaux pertinents et pouvant, en cas de succès, mener à des essais cliniques.

Pour atteindre cet objectif, de nombreux équipements d'imagerie sont à la disposition des équipes multidisciplinaires de MIR Cen. Ceux-ci leur permettent d'acquérir un grand nombre de données aussi bien *in vivo* que *post mortem* et de mener leurs projets de recherche. La réunion des différents savoir-faire au sein d'une même plateforme permet à ces équipes d'interagir entre elles et d'associer leurs compétences. Des études transversales

---

a. Molecular Imaging Research Center

ont ainsi été mises en place et réunissent à la fois des médecins, des biologistes, des physiciens et des chercheurs en traitement des images. Les critères de performance exigée par chacun multiplient ainsi la qualité des résultats fournis et font avancer efficacement la Recherche médicale.

Le **travail de recherche** présenté dans ce manuscrit de thèse est le fruit d'une collaboration entre les équipes de traitement d'images et de biologie de MIRCen travaillant notamment sur des modèles transgéniques murins de la maladie d'Alzheimer. Il a visé à mettre en place une **stratégie d'analyse des images acquises par les biologistes afin de faciliter leur interprétation et accéder à de nouvelles informations**. Les images concernées ont principalement été constituées de coupes histologiques et autoradiographiques, modalités d'imagerie *post mortem* anatomiques et fonctionnelles considérées encore aujourd'hui comme des modalités d'imagerie de référence. Pour traiter un grand nombre de coupes et s'affranchir du caractère bidimensionnel des images natives, des travaux ont été réalisés pour reconstruire des images tridimensionnelles à partir de séries de coupes. Le **travail de thèse** décrit dans ce mémoire a consisté à **automatiser** et à **optimiser l'analyse** de ce type de données **en utilisant un atlas numérique 3D**.

La présentation du travail réalisé est composée de cinq chapitres.

Le **chapitre 1** présente le contexte biomédical dans lequel s'inscrit ce travail de recherche. Les intérêts de la recherche pré-clinique ainsi que des modèles murins de la maladie d'Alzheimer sont présentés. Les principales techniques d'imagerie utilisées *post mortem* et *in vivo* pour étudier la Souris sont ensuite décrites ce qui nous permet de comprendre les raisons pour lesquelles l'imagerie *post mortem* reste la référence pour étudier le petit animal. Un état de l'art des différentes méthodes mises au point par les chercheurs en traitement d'images pour apparier et analyser les informations issues de plusieurs images (mono et multimodales) est dressé. Les limitations des méthodes existantes pour analyser des images *post mortem* sont explicitées et permettent d'introduire la problématique et les objectifs de ce travail de recherche. Nous décrivons l'**approche d'analyse de données proposée basée sur la mise en correspondance d'un atlas numérique 3D avec des images obtenues *post mortem* et reconstruites au préalable en 3D**.

La démarche proposée pour optimiser l'analyse de données *post mortem* a été développée en utilisant deux atlas numériques tridimensionnels de cerveau de souris mis à la disposition de la communauté scientifique *via* un réseau de recherche (le BIRN, <http://www.birncommunity.org/>). Pour évaluer notre approche, nous avons travaillé sur un jeu de données du laboratoire acquis dans le cadre d'une étude préliminaire sur la maladie d'Alzheimer et constitué de deux groupes de souris transgéniques. L'ensemble de ces données est présenté dans le **chapitre 2**.

La stratégie de recalage d'un atlas numérique 3D sur des volumes de données *post mortem* sur laquelle s'est appuyée la méthode d'analyse d'images proposée est décrite dans le **chapitre 3**. Des évaluations qualitatives et quantitatives ont attesté de la faisabilité et de la validité de notre approche d'analyse. Ayant à disposition deux modèles numériques de cerveau de souris, nous avons effectué des tests permettant de sélectionner l'atlas le plus adapté pour analyser le jeu de données expérimentales considéré. Nous l'avons utilisé pour étudier l'anatomie et la fonction des animaux de la base. La fin de ce chapitre dresse un bilan des résultats obtenus et des apports et limitations d'une telle approche d'analyse.

Une autre méthode d'analyse d'images cérébrales consiste à comparer statistiquement les intensités des pixels des images. Cette approche permet de mettre en évidence des variations fonctionnelles inter-groupe locales et souvent non détectables par une analyse à l'échelle de la structure anatomique telle que celle réalisée par l'atlas. Depuis peu utilisée dans le cadre d'études sur le Rongeur, cette analyse fournit des résultats encore complexes à interpréter. Aussi, pour tirer profit des avantages offerts par cette approche et ceux de l'analyse par atlas, nous avons proposé dans le **chapitre 4** de combiner ces deux méthodes d'analyse complémentaires. L'objectif de ce travail a été d'automatiser l'indexation des variations fonctionnelles inter-groupe mises en évidence par l'analyse statistique dans des structures anatomiques. La première partie de ce chapitre présente l'analyse statistique réalisée sur les données fonctionnelles de notre étude. Le recalage d'un atlas numérique sur l'image paramétrique a été évalué qualitativement et quantitativement. Nous avons ensuite étudié les résultats d'indexation des zones de variations métaboliques détectées entre les deux lignées de souris dans les régions cérébrales définies dans l'atlas. Une synthèse des apports de cette combinaison de méthodes d'analyse clôt le chapitre.

Enfin, le **chapitre 5** présente une des perspectives de ce travail de recherche : l'analyse par atlas d'images fonctionnelles cérébrales acquises *in vivo* chez la souris. L'approche proposée a reposé sur le recalage d'un atlas numérique sur une image anatomique acquise simultanément avec l'image fonctionnelle avec un système hybride TEP/TDM. Le travail décrit dans ce chapitre est préliminaire mais les résultats sont prometteurs.

Une synthèse des travaux réalisés et contributions apportées à la recherche biomédicale est présentée en fin de manuscrit. D'autres perspectives de ce travail de thèse sont alors proposées, en particulier celles concernant l'analyse par un seul outil d'analyse, l'atlas numérique, de données acquises *in vivo* et *post mortem* sur des mêmes sujets.

# Chapitre 1

## Analyse d'images en recherche pré-clinique

*Ce premier chapitre a pour objectif de faire un état des lieux de l'imagerie en recherche pré-clinique et plus précisément de l'analyse des images obtenues. Pour cela, le contexte biomédical dans lequel s'inscrit ce projet de thèse est d'abord présenté : il s'agit d'études sur les maladies neurodégénératives humaines, en particulier la maladie d'Alzheimer, modélisées sur le petit animal. Les différentes techniques d'imagerie généralement utilisées sont ensuite décrites et comparées entre elles; un état de l'art des techniques de mise en correspondance d'informations présentes dans différentes images est ensuite dressé. Les approches d'analyse utilisées pour étudier ces modèles animaux sont exposées et leurs limitations commentées. La problématique de recherche sur laquelle j'ai travaillé pendant ma thèse est explicitée en fin de chapitre. La figure 1.1 présente une vue synthétique de l'organisation de ce chapitre ainsi que des principaux points abordés.*

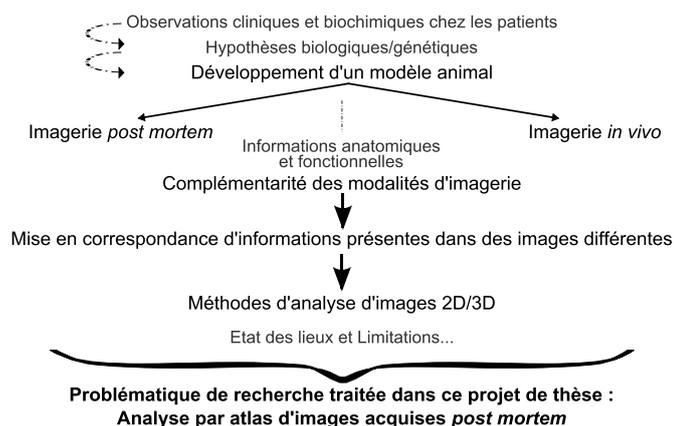


Figure 1.1 – Organisation du chapitre 1 de ce manuscrit et principaux points abordés.

## 1.1 Recherche pré-clinique

Le but premier de la **recherche biomédicale** est de comprendre les mécanismes physiologiques du corps humain, des processus pathologiques et de permettre le développement de nouvelles thérapeutiques. Cette science peut être divisée en trois branches : la recherche fondamentale, la recherche pré-clinique et la recherche clinique. Alors que les études cliniques s'intéressent exclusivement à l'être humain, en analysant notamment l'évolution d'une pathologie particulière ou bien les effets de certaines approches thérapeutiques sur celle-ci, les recherches fondamentales et pré-cliniques consistent à mimer ces pathologies humaines respectivement *in vitro* et sur des modèles animaux. Ces études sont principalement menées sur des mammifères, tels que le Rongeur ou le Primate. Elles sont réalisées en amont des tests effectués sur l'Homme afin de caractériser au mieux la pathologie ciblée pour développer et valider de nouvelles thérapeutiques, et ce, dans l'optique d'optimiser leurs chances de succès chez les patients. Ces étapes sont donc primordiales, incontournables et aujourd'hui obligatoires pour aborder dans les meilleures conditions le passage en clinique. Depuis les années 1980, des lois nationales, comme le décret français 87/848, et internationales, comme la directive européenne 86/609/CEE, ont été mises en place pour réglementer et utiliser à bon escient des animaux pour la recherche biomédicale. Leur environnement vital doit être respecté, un certain confort lors de leur captivité doit être procuré et les souffrances éventuelles générées par des manipulations invasives doivent être réduites.

### 1.1.1 Un modèle animal de prédilection, la Souris

Pour appréhender les mécanismes physiopathogéniques des maladies et par extension les effets des thérapies, les biologistes ont recours à l'utilisation du petit animal, tel que la Souris ou le Rat. Ces espèces sont largement utilisées en laboratoire du fait de la facilité de leur élevage et leur reproduction rapide (environ 3 semaines). Plusieurs études exploratoires peuvent alors être menées plus facilement sur des sujets. Les études les plus pertinentes sont ensuite transposées sur le Primate, espèce animale, proche de l'Homme, qui nécessite un temps de gestation plus important que les rongeurs (près de 6 mois pour le Babouin) et des conditions d'élevage plus contraignantes.

Les rongeurs ne présentent pas spontanément les mêmes pathologies que l'Homme, mais leurs génomes sont bien connus des scientifiques. Des études ont par exemple montré que bien que le génome de la Souris ne comporte que  $2,5 \cdot 10^9$  paires de nucléotides, contre  $3,2 \cdot 10^9$  chez l'Homme, 99% de nos gènes sont communs avec ceux de cet animal<sup>a</sup>. Les biologistes parviennent aujourd'hui à manipuler le génome des rongeurs, plus facilement celui de la Souris que celui du Rat, pour créer des lignées transgéniques robustes

---

a. Source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome>

capables de mimer assez fidèlement certains aspects de pathologies, comme ceux des maladies neurodégénératives.

Les données sur lesquelles j'ai travaillé durant ma thèse ont été acquises chez la Souris, espèce sur laquelle est focalisé le manuscrit.

## 1.1.2 Modélisation de la maladie d'Alzheimer sur la Souris

### 1.1.2.1 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative. Elle se manifeste progressivement par des troubles de mémoire et des capacités cognitives altérées. Ce vieillissement cérébral pathologique perturbe, dans un premier temps, les activités quotidiennes des patients puis réduit gravement leur autonomie au point qu'une non-assistance permanente peut leur être fatale.

Cette maladie est la forme de démence la plus fréquente chez les personnes âgées ; elle constitue environ 65 % des cas de démence. Elle touche aujourd'hui 860 000 personnes en France. En raison du vieillissement de la population et ses conséquences sociales et humaines, la maladie d'Alzheimer est devenue un problème de Santé Publique. Les recherches sur cette maladie doivent être approfondies pour prévenir, ralentir et soigner cette pathologie.

Bien qu'elle ait été identifiée pour la 1<sup>ère</sup> fois il y a un siècle par le neurologue allemand Alois Alzheimer, les causes exactes de cette maladie ne sont pas encore réellement connues. Les chercheurs supposent néanmoins qu'il existe des facteurs environnementaux et génétiques contribuant à son déclenchement.

### 1.1.2.2 Étude de la maladie

Pour modéliser la maladie d'Alzheimer, les biologistes ont cherché à reproduire deux de ses caractéristiques majeures détectables *post mortem* dans le cerveau humain :

- l'apparition de structures neurofibrillaires intra-neuronales (Iqbal et al., 2000; Medeiros et al., 2010) ;
- l'apparition de plaques amyloïdes extracellulaires (Masliah, 2008; Jack et al., 2010).

**Les structures neurofibrillaires** sont des agrégats de filaments hélicoïdaux appariés, constitués principalement de la **protéine Tau**<sup>b</sup>, protéine associée à la stabilité des microtubules du cytosquelette. Ces interactions de la protéine Tau avec les microtubules sont régulées par phosphorylation<sup>c</sup>. Dans les cas pathologiques étudiés, cette protéine est hyperphosphorylée. Son affinité avec les microtubules est alors diminuée, ce qui peut expliquer la présence d'amas de protéines Tau entre les cellules, la désorganisation du cytosquelette, voire l'apoptose neuronale. La **figure 1.2** illustre le dysfonctionnement de cette protéine (appelé *tauopathie*) impliquée dans la maladie d'Alzheimer.

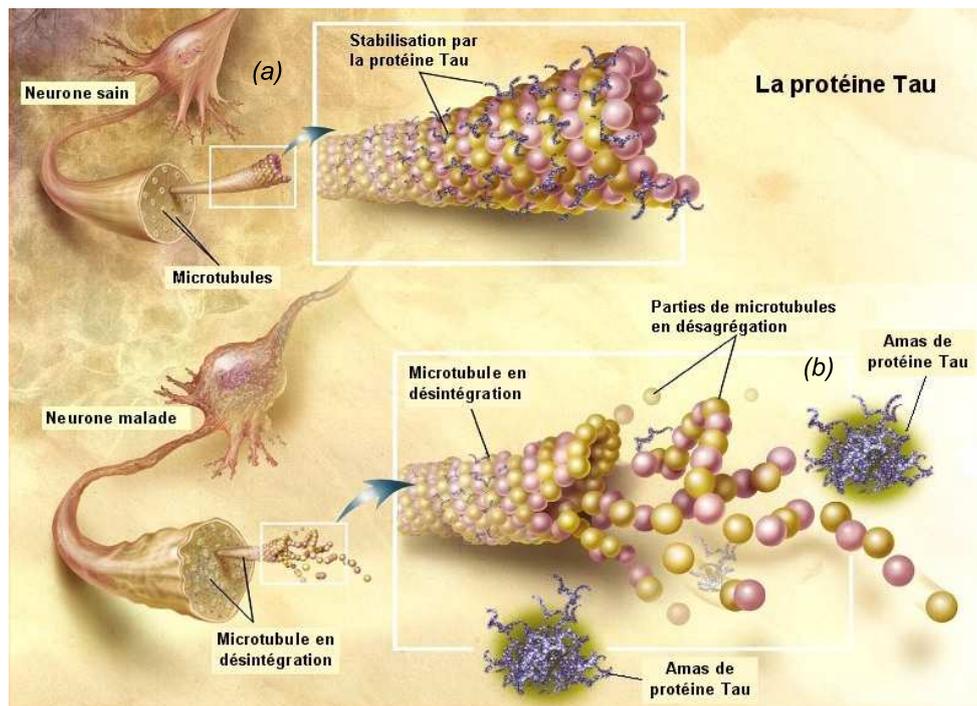


Figure 1.2 – Dégénérescence de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer. La protéine Tau est associée à la stabilité des microtubules contenus dans un neurone (a). Dans des cas pathologiques étudiés, une désintégration des microtubules a été observée, formant des amas de protéines Tau entre les cellules (b). D'après <http://www.web-books.com/>.

b. La protéine Tau est codée par un gène du chromosome 17 chez l'Homme et du chromosome 11 chez la Souris.

c. La phosphorylation est l'addition d'un groupe phosphate ( $\text{PO}_4$ ) à une protéine ou à une petite molécule.

**Une plaque amyloïde** est une accumulation extracellulaire du peptide  $A\beta$  issu du clivage de la protéine amyloïde précurseur du peptide (*amyloid precursor protein*, APP)<sup>d</sup> par les enzymes  $\beta$ - et  $\gamma$ - secrétases (cf. figure 1.3) (Kang et al., 1987). La formation de dépôts insolubles dans le milieu extracellulaire (*amyloïdose*) serait neurotoxique et entraînerait une neurodégénérescence, plus particulièrement au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe, régions cérébrales notamment impliquées dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Hardy, 1997).

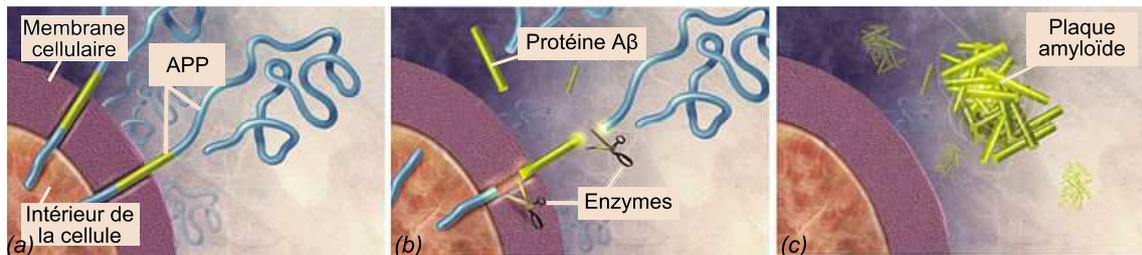


Figure 1.3 – Cellule normale (a). Clivages de l'APP par les  $\beta$ - et  $\gamma$ - secrétases, enzymes représentées ici par des ciseaux (b). Formation d'une plaque amyloïde extracellulaire (c). D'après <http://www.nia.nih.gov/>.

Dans les années 1990, Hardy et son équipe ont démontré que plusieurs patients atteints de formes familiales de la maladie d'Alzheimer avaient une mutation pathogène du gène de l'APP (Hardy, 1997). Par la suite, d'autres mutations ont été découvertes. Tout porteur de ces mutations autosomiques dominantes<sup>e</sup> développe la maladie. Ces modifications génétiques perturberaient par ailleurs le métabolisme initial de l'APP. Il en est de même pour les mutations sur le gène de la préséniline 1 (PS1)<sup>f</sup>.

En intégrant au génome de la Souris des gènes humains mutés codant pour l'APP et la PS1, les biologistes ont réussi à induire une amyloïdose chez les animaux de cette espèce. Ces sujets transgéniques sont couramment appelés **souris APP/PS1** (Jankowsky et al., 2002; Blanchard et al., 2003; Sadowski et al., 2004; Delatour et al., 2006; Duyckaerts et al., 2008).

d. Le gène codant pour l'APP se situe sur le chromosome 21 chez l'Homme et le chromosome 16 chez la Souris.

e. Une mutation est dite "autosomique dominante" lorsqu'elle est située sur un chromosome non sexuel (ni X, ni Y) et que la présence d'un seul allèle morbide est suffisante pour que la maladie s'exprime.

f. Le gène codant pour la PS1 est situé sur le chromosome 14 chez l'Homme et sur le chromosome 12 chez la Souris.

## 1.2 L'imagerie, outil d'investigation incontournable

Pour étudier, analyser, voire quantifier les conséquences de telles mutations génétiques, les biologistes peuvent utiliser des tests comportementaux, tel que le test du *water maze*. Ce test a été proposé par Morris en 1981 pour évaluer chez un rongeur, immergé dans un environnement plus ou moins stressant, l'apprentissage et la mémorisation d'un chemin (Morris, 1981). Cependant, pour mesurer les altérations morphologiques et même fonctionnelles engendrées par diverses pathologies et par la suite mieux comprendre leurs conséquences sur le cerveau et le reste de l'organisme, les chercheurs ont mis au point des techniques permettant d'observer le corps dans son entier ou en partie, dans un premier temps *post mortem*, *i.e.*<sup>g</sup> une fois le sujet étudié euthanasié, mais également, avec les progrès technologiques récents, *in vivo*, *i.e.* en maintenant ses constantes vitales. Les paragraphes 1.2.1 et 1.2.2 présentent les principales techniques permettant de procurer aux chercheurs, des "images" du sujet qu'ils étudient. Les modalités présentées ont été utilisées dans mon projet de thèse.

### 1.2.1 Imagerie *post mortem*

L'imagerie dite *post mortem* désigne toute technique mise au point pour acquérir une image de l'organisme d'un sujet après sa mort. L'ensemble des techniques décrites dans ce paragraphe exigent l'extraction de l'organe que l'on cherche à étudier. Les tissus observés étant à l'extérieur de leur environnement naturel, les modalités présentées ici sont également qualifiées, dans la suite du manuscrit, de techniques d'**imagerie *ex situ***. Les chercheurs travaillent généralement sur des coupes fines de l'organe étudié. Ils utilisent ensuite des radiotraceurs et/ou des colorants pour mettre en évidence sur les coupes bidimensionnelles prélevées (2D), de façon spécifique et avec une résolution spatiale microscopique, les sous-structures (information anatomique), voire leurs fonctionnements (information fonctionnelle telle que le métabolisme du glucose) au moment du décès du sujet.

Extraire un organe de son environnement naturel, le découper et l'étudier *post mortem* entraînent des déformations qui peuvent fausser par la suite l'analyse et les interprétations des observations réalisées. La préparation des échantillons ainsi que le protocole d'imagerie, *i.e.* la mise en évidence de ce que l'on souhaite observer sont donc des étapes délicates qu'il ne faut pas négliger. Selon les études envisagées, chaque équipe met au point, au sein de son laboratoire, des protocoles de prélèvement et de coupe d'organes, ainsi que des techniques de coloration ou révélation de traceurs radioactifs. Par souci de concision, la présentation de ces différentes techniques est limitée à celles exploitées pour l'obtention des données de mon projet de thèse. Les prochains points développés dans ce paragraphe concernent donc uniquement les protocoles d'acquisition de coupes cérébrales de souris réalisés sur

---

g. *i.e.* : abréviation de l'expression latine "*id est*" signifiant "c'est-à-dire".

tissu frais et les techniques d'imagerie permettant d'obtenir les informations anatomiques et fonctionnelles dont je me suis servie durant ma thèse.

### 1.2.1.1 Obtention des coupes de tissu

La première étape à réaliser pour acquérir des images *post mortem* d'un cerveau de souris est l'**extraction** de cet organe. La dissection des échantillons doit être réalisée le plus rapidement possible après l'euthanasie de l'animal et avec précaution pour éviter toute détérioration *post mortem* de l'échantillon.

Le cerveau est immédiatement congelé pour conserver et figer les structures cérébrales dans un état le plus proche possible de l'état du vivant et ainsi minimiser des déformations dites *primaires*. Ces déformations peuvent être dues à des changements de conditions mécaniques et/ou physiologiques tels que la variation de pression intra-crânienne, la fuite de liquide céphalo-rachidien ou de sang ou encore l'action d'enzymes sur les tissus. Elles peuvent altérer la géométrie tridimensionnelle de l'échantillon. Par ailleurs, l'étape de **congélation** permet de préparer le tissu afin de le couper dans les meilleures conditions possibles. Pour cela, le cerveau est immergé dans de l'isopentane refroidi à  $-40^{\circ}\text{C}$  et conservé ensuite à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Les cerveaux peuvent alors être coupés en tranches de  $20\ \mu\text{m}$  d'épaisseur à l'aide d'un microtome maintenu à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans un **cryostat**. Les coupes peuvent être réalisées en incidence coronale, axiale ou sagittale (voir [figure 1.4](#)) (ou de biais par rapport à ces incidences selon l'étude à mener). Le cerveau est fixé sur un support à l'aide d'un **milieu d'enrobage**. Les coupes sont alors prélevées sur des **lames de verre** adhésives et séchées rapidement. La découpe de l'échantillon provoque inévitablement la **perte de sa cohérence tridimensionnelle**. De plus, les perturbations physico-chimiques dues aux changements de températures auxquelles sont soumis les tissus et la manipulation des prélèvements peuvent engendrer des déformations locales dites *secondaires* propres à chaque coupe 2D. Malgré l'attention prêtée, l'opérateur peut cisailer, déchirer ou plisser les coupes en les prélevant et les déposant sur la lame de verre.

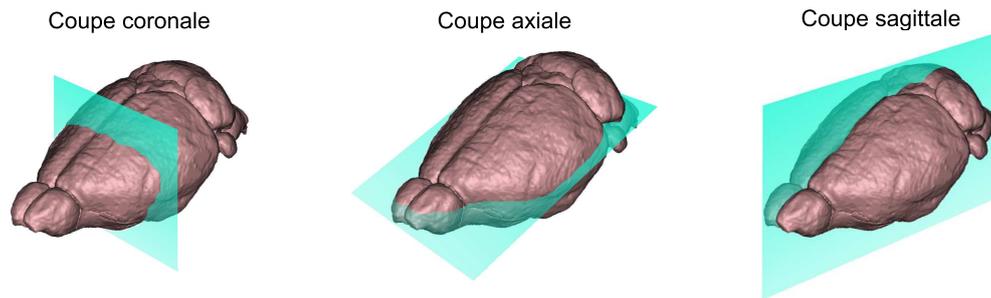


Figure 1.4 – Illustration de trois plans de coupe utilisés (en bleu) superposés à un modèle surfacique tridimensionnel de cerveau de souris (rose). Les coupes coronales et axiales sont également respectivement appelées “coupes frontales” et “coupes transverses”.

L'ensemble de ce protocole de prélèvement de coupes cérébrales est schématisé en figure 1.5.

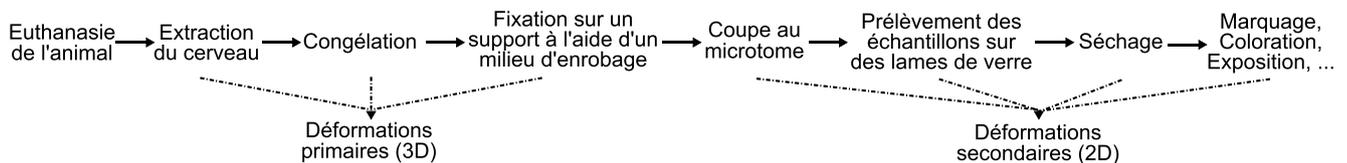


Figure 1.5 – Protocole de prélèvement de coupes de cerveau.

### 1.2.1.2 Révélation de traceurs radioactifs injectés dans l'organisme vivant

Pour obtenir *ex vivo*, des informations fonctionnelles sur l'animal au moment de son euthanasie, telles que la consommation, la synthèse ou biodistribution de peptides ou encore le débit sanguin, les biologistes ont souvent recours à la technique d'imagerie appelée **autoradiographie**. Le principe de cette méthode repose sur la révélation de molécules marquées par des radioisotopes sur un film photographique pour suivre la synthèse des protéines. Injectés *in vivo*, elles sont biodistribuées et métabolisées par l'organisme comme les composés naturels. Prenons l'exemple du processus appelé *métabolisme énergétique* : cet ensemble de réactions chimiques représente les dépenses énergétiques d'un sujet. Cette énergie est principalement produite par la consommation de glucose (voir figure 1.6). L'injection de 2-désoxyglucose marqué au carbone 14 ( $[^{14}\text{C}]2\text{DG}$ ) dans l'animal vivant va mettre en compétition cet analogue du glucose radiomarké avec le sucre naturel. Cependant, n'étant pas totalement utilisé au cours de la glycolyse, le  $[^{14}\text{C}]2\text{DG}$  va s'accumuler dans les endroits où le glucose est consommé.

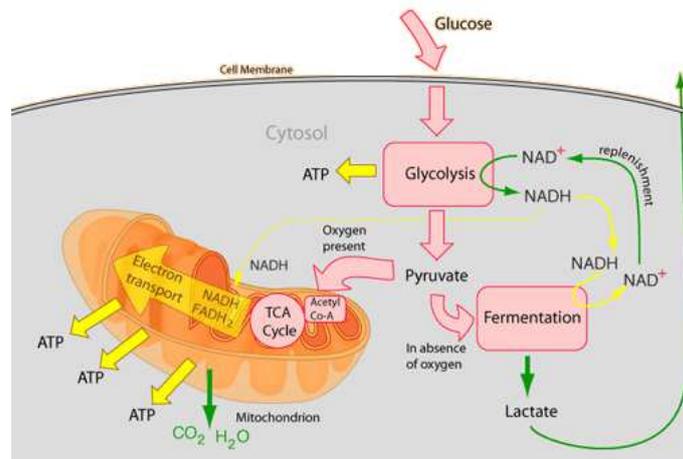


Figure 1.6 – Consommation de glucose et réserve d'énergie de l'organisme (symbolisé par "ATP", adénosine triphosphate). Source : <http://www.gsu.edu/>.

Les coupes de tissu contenant les molécules radioactives doivent être déshydratées (chauffage des lames de verre) afin de limiter la diffusion des radioéléments dans le reste de la coupe. Au contact d'un film autoradiographique, constitué notamment de grains ou de cristaux d'halogénure d'argent, les particules  $\beta$  du  $[^{14}\text{C}]\text{2DG}$  présents dans le tissu vont réduire les ions argent en atomes d'argent métallique et ainsi s'imprimer sur le film. L'activité énergétique, ou encore la prise de glucose de l'animal figé au moment de son euthanasie, va ainsi pouvoir être observée par autoradiographie. La réduction des ions argent étant fonction du nombre de radiations émises à un endroit particulier de la coupe, cette technique d'imagerie permet de mesurer le processus fonctionnel auquel elle est associée (dans notre exemple, l'activité énergétique).

La résolution des autoradiographies étudiées dépend de plusieurs paramètres : l'énergie du radioélément, la résolution du film révélateur et l'échantillonnage induit par une éventuelle numérisation pour faciliter l'analyse (point plus détaillé en section 1.4 (p. 38)). Typiquement, des images autoradiographiques révélant la fixation de  $^{14}\text{C}$  ont une résolution spatiale estimée à quelques dizaines de micromètres avant numérisation.

La révélation du  $[^{14}\text{C}]\text{2DG}$  injecté par voie intraveineuse par autoradiographie est illustrée en figure 1.7(a). Sur cette coupe, le  $[^{14}\text{C}]\text{2DG}$  a particulièrement interagi avec le film au niveau de certaines zones corticales, hippocampiques et thalamiques. L'activité énergétique de l'animal avant son euthanasie était donc plus importante dans ces régions. Cependant, cette image montre également que les structures anatomiques ne sont pas clairement identifiables. Des méthodes permettant de corrélérer une information anatomique plus précise avec l'autoradiographie, ainsi que différentes approches pour les analyser seront présentées dans la suite du manuscrit.

### 1.2.1.3 Coloration et techniques de marquages histologiques

Pour obtenir des images dites anatomiques, les chercheurs ont à leur disposition une grande variété de colorants et de marqueurs histochimiques, histoenzymologiques et immunohistochimiques permettant de mettre en évidence différents types moléculaires. Les lipides, glucides et protéines vont par exemple être mis en évidence grâce à des marqueurs histochimiques, les enzymes par des marqueurs histoenzymologiques et les sites de liaison d'un anticorps spécifique à une protéine par des marqueurs immunohistochimiques (ou immunocytochimiques). Ces solutions étant en phase aqueuse, les coupes prélevées doivent d'abord être réhydratées. Avant cela, les échantillons, montés sur des lames de verre, sont plongés dans un solvant (toluène) puis nettoyés dans une série décroissante d'éthanol. La ré-hydratation est ensuite achevée en utilisant de l'eau distillée. Les coupes sont alors colorées dans une solution aqueuse. Pour fixer la coloration tout en préservant les échantillons, les coupes sont rincées dans de l'eau puis de nouveau plongées dans des bains d'alcool et de solvant. A l'aide d'une résine synthétique, une lamelle est déposée sur chaque échantillon monté sur lame de verre. Ces montages sont par la suite souvent analysés par des systèmes optiques fonctionnant en transmission (microscope, numériseur). Aussi, pour minimiser les aberrations chromatiques et sphériques, l'indice de réfraction de la lamelle est proche de celui du verre ( $\simeq 1,5$ ).

La **technique de Nissl**, mise au point au début du XX<sup>ème</sup> siècle par l'histologiste Franz Nissl, est un exemple de méthode de coloration particulièrement utile en neuropathologie car elle ne fait apparaître, en utilisant des colorants tels que le **violet de crésyl**, le bleu de toluidine ou encore la thionine, que les corps cellulaires des neurones (partie centrale des neurones dont le diamètre varie, selon leur type, entre 5 et 120  $\mu\text{m}$ ) et non leurs prolongements (axones). Ce type de coloration permet de mettre en évidence l'organisation structurelle du cerveau.

La coloration d'une coupe de cerveau de souris au violet de crésyl est illustrée en [figure 1.7\(b\)](#). Cette figure met en évidence des structures cérébrales telles que l'hippocampe, région entourée d'une couche de corps cellulaires neuronaux par conséquent particulièrement marquée par ce colorant. En revanche, le corps calleux, faisceaux d'axones pour l'essentiel, n'a pas beaucoup fixé le colorant et apparaît donc très clair sur cette même image.

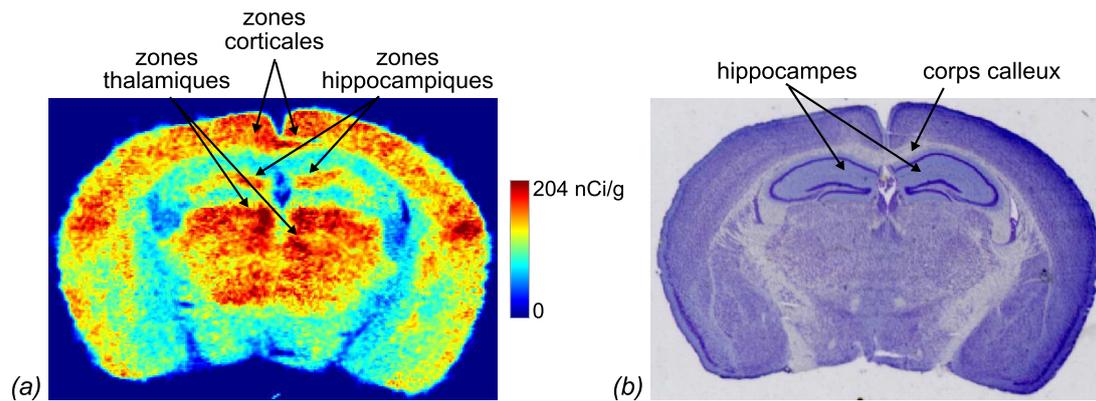


Figure 1.7 – (a) Coupe autoradiographique de cerveau de souris sur laquelle le  $[^{14}\text{C}]2\text{DG}$  a particulièrement interagi avec le film au niveau de certaines zones corticales, hippocampiques et thalamiques. (b) Coupe histologique de cerveau de souris colorée au violet de crésyl (colorant mettant en évidence les corps cellulaires des neurones) correspondant à la coupe montrée en (a). L'hippocampe est une structure entourée d'une couche de corps cellulaires neuronaux donc particulièrement bien coloré avec ce marquage. À l'inverse, le corps calleux est une région essentiellement constituée de faisceaux d'axones ; le colorant est donc très peu fixé dans cette structure qui apparaît donc très claire sur cette image. Les images (a) et (b) ont été acquises à MIRCen dans le cadre de l'étude Herard et al. (2009).

L'imagerie *post mortem*, obtenue par autoradiographie ou coloration de coupes prélevées, fournit, très spécifiquement, des informations fonctionnelles (comme le métabolisme) ou anatomiques (comme l'organisation structurale) de hautes résolutions spatiales (de l'ordre de grandeur du composé cellulaire marqué). La qualité et la résolution de ces images font de ces modalités des outils de référence pour les biologistes. Cependant, ces données sont bidimensionnelles et nécessitent obligatoirement l'euthanasie de l'animal. Le nombre de sujets étudiés est donc limité. Par ailleurs, l'évolution d'une pathologie, ou celle d'un traitement administré, ne peut être évaluée sur un même animal avec ces techniques d'imagerie. Pour pallier ce problème, d'autres techniques d'imagerie, initialement développées pour l'Homme, sont de plus en plus utilisées afin d'étudier les modèles animaux *in vivo*, et de permettre ainsi la réalisation de suivis longitudinaux.

### 1.2.2 Imagerie *in vivo*

L'acquisition d'images sur un sujet vivant permet d'envisager des études longitudinales, *i.e.* d'acquérir sur un même animal plusieurs images à différents temps. L'**imagerie** dite ***in vivo*** est née à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle avec la découverte du rayonnement X par le physicien Wilhelm Röntgen. En envoyant un faisceau X sur la main de sa femme, ce scientifique est parvenu à acquérir une image de projection des différents os de la main et à imprimer le résultat sur une plaque photographique. Une illustration de cette première image acquise *in vivo* se trouve en figure 1.8. Nous pouvons remarquer que les os de la main sont entourés d'une ombre qui n'est autre que l'image de la chair.



Figure 1.8 – Image par rayons X de la main de la femme de Wilhelm Röntgen, réalisée le 22/12/1895. Source : <http://science.nasa.gov/>.

Cette technique d'imagerie planaire, ionisante et anatomique s'appelle la **radiographie**. L'image formée est une cartographie bidimensionnelle de la projection sur un détecteur (ici la plaque photographique) des coefficients d'atténuation caractérisant les différents milieux traversés par le rayonnement X pour une énergie donnée. L'os est un matériau plus dense que les tissus mous (comme la chair); il apparaît donc sur l'image en hypodensité par rapport à ces autres matériaux.

Se présentant comme une bonne alternative à l'imagerie acquise *post mortem*, beaucoup de scientifiques se sont intéressés au développement de divers systèmes d'acquisition d'images *in vivo*. Initialement mis au point pour étudier le corps humain, ces systèmes sont de plus en plus adaptés pour observer d'autres espèces, notamment la Souris. Pour faire bénéficier la recherche pré-clinique des avantages de ce type d'imagerie (informations anatomiques ou fonctionnelles différentes, réalisation possible de suivis longitudinaux), les chercheurs doivent s'efforcer de rendre compatibles ces systèmes avec les faibles dimensions des organes à étudier, tout en préservant une résolution d'image adéquate pour étudier ces petites structures : le cerveau d'une souris mesure en moyenne 0,5 cm<sup>3</sup>, soit près de 1/3000 de celui d'un humain ( $\simeq 1400$  cm<sup>3</sup>)<sup>h</sup> (Johnson et al., 2007). Nous présentons par la suite quelques systèmes d'imagerie utilisés pour étudier *in vivo* le petit animal.

h. Source : <http://hypertextbook.com/>

### 1.2.2.1 Imagerie par TomoDensitoMétrie

L'imagerie par TomoDensitoMétrie (**TDM**), encore appelée **scanographie** ou *Computerized Tomography* (CT), est une technique d'imagerie qui repose sur le même principe physique que la radiologie dite conventionnelle, présentée dans le paragraphe précédent, *i.e.* sur l'absorption du rayonnement X par les tissus traversés. Apparue dans les années 1970 avec l'avènement des ordinateurs et l'ingéniosité des physiciens Sir Godfrey Newbold Hounsfield et Allan MacLeod Cormack, la TDM fournit des **images anatomiques tridimensionnelles** contrairement aux radiographies classiques. Pour reconstruire les organes étudiés dans leur géométrie d'origine, plusieurs images sont acquises lors de l'examen grâce à la rotation d'une source de rayonnement et/ou de multiples détecteurs autour du sujet<sup>i</sup> (cf. figure 1.9(a)). Des algorithmes de reconstruction, basés sur les transformées de Radon ou de Fourier, permettent par la suite de former des images 3D et quantitatives. Chaque niveau de gris de l'image produite caractérise en effet précisément le tissu traversé en ce point de part sa densité (étalonnage de ces intensités sur l'Échelle de Hounsfield<sup>j</sup>). Sur des systèmes adaptés, une image TDM acquise sur une souris peut avoir une résolution spatiale isotrope de l'ordre de quelques dizaines de micromètres pour une durée d'acquisition d'environ 5 min<sup>k</sup>. Pour comparaison, une image TDM acquise en moins d'une minute chez l'Homme peut atteindre une résolution spatiale de l'ordre de  $1 \times 1 \times 5 \text{ mm}^3$ .

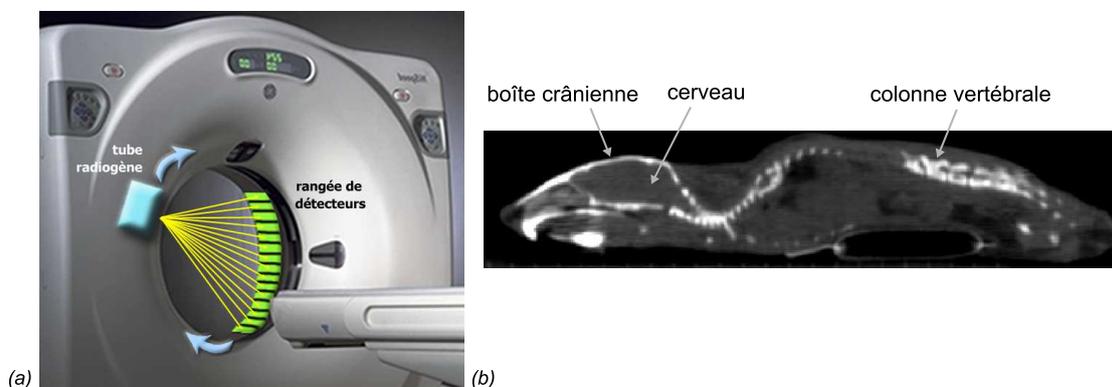


Figure 1.9 – Imagerie par TomoDensitoMétrie : (a) Schéma de principe du fonctionnement d'un tomodynamomètre où la source de rayonnement X (tube radiogène) ainsi que les détecteurs tournent autour du sujet (D'après <http://www.medvet.umontreal.ca/>). (b) Image TDM acquise sur une souris (vue sagittale), d'après l'étude décrite dans *Delzescaux et al. (2010)*. Le squelette de l'animal (boîte crânienne et colonne vertébrale par exemple) est bien identifiable sur cette image alors que les tissus situés à l'intérieur d'une cavité osseuse (comme le cerveau) ne sont pas du tout contrastés entre eux.

i. Selon la génération des appareils

j. Pour identifier facilement les tissus observés, Hounsfield a pondéré chaque niveau de gris de l'image par celui qu'il obtenait lorsque le faisceau de rayons X traversait de l'eau. Cette échelle de Hounsfield s'échelonne, en unités Hounsfield (UH), de -1000 pour l'air à +1000 pour l'os dense cortical, en passant par -50 pour la graisse et 0 pour l'eau.

k. Source : <http://www.microphotonics.com/>

Les rayons X sont beaucoup plus absorbés par les structures osseuses que par les tissus mous. Il est donc difficile d'observer par TDM, des tissus se situant à l'intérieur de compartiments osseux, tels que le cerveau (cf. [figure 1.9\(b\)](#)). Seule, cette modalité d'imagerie est donc peu adaptée aux études menées en neuroanatomie.

### 1.2.2.2 Imagerie par Résonance Magnétique

L'Imagerie par Résonance Magnétique (**IRM**) est une technique qui crée une image d'un corps en exploitant les propriétés magnétiques des noyaux de certains atomes. Étant le plus abondant dans l'organisme, l'hydrogène ( $^1\text{H}$  - présent dans l'eau) est l'atome le plus observé. Le sujet à étudier est d'abord placé dans un champ magnétique statique qui force les moments magnétiques des noyaux des atomes à s'aligner avec lui. Cet état d'équilibre est ensuite perturbé par l'application d'un second champ magnétique oscillant (onde radiofréquence) orthogonal au premier. Le système cherche alors à retrouver son état d'équilibre. L'image enregistrée est en fait la transformée de Fourier de la densité d'aimantation de l'objet pendant ce retour à l'équilibre. Cette densité est pondérée par plusieurs termes de relaxation : la relaxation caractérisée par la constante de temps "T1" (relaxation longitudinale), et la relaxation caractérisée par la constante de temps "T2" (relaxation transversale).

En intervenant par la suite sur le temps entre deux perturbations magnétiques (temps de répétition TR) et celui entre l'excitation et la réception de l'onde émise par les noyaux (temps d'écho TE), l'opérateur va pouvoir moduler le contraste des images et mettre en évidence certaines structures aux dépens d'autres. En diminuant par exemple le TR et le TE, la détection des structures à T1 court est favorisée : la graisse va apparaître en hypersignal, à l'opposé des fluides, notamment le liquide céphalo-rachidien. Les tissus mous, comme ceux de la matière grise (exemple le cortex) et de ceux de la matière blanche du cerveau (exemple le corps calleux), vont être contrastés entre eux. Ce contraste au niveau cérébral est considéré comme "anatomique" car la matière grise est en hyposignal par rapport la matière blanche (cf. [figure 1.10\(a\)](#)). Le type d'images produites avec de tels paramètres est appelé **IRM pondérée en T1**.

Si au contraire le temps d'écho est rallongé, la détection des structures à T2 long est favorisée. Les fluides vont apparaître en hypersignal et les tissus mous avoir des contrastes inversés par rapport au contraste anatomique T1 (cf. [figure 1.10\(b\)](#)). Tout tissu entouré de fluides, telle qu'une partie de l'hippocampe, est bien mis en évidence. Cette image, dite **IRM pondérée en T2**, est très utilisée pour étudier les lésions tissulaires associées à des œdèmes.

D'autres séquences peuvent être paramétrées et mettre en évidence des processus physiologiques tels que la concentration de désoxyhémoglobine par tissu. Ce dernier exemple permet ainsi d'acquérir une image fonctionnelle par IRM, aussi appelée IRM fonctionnelle (IRMf).

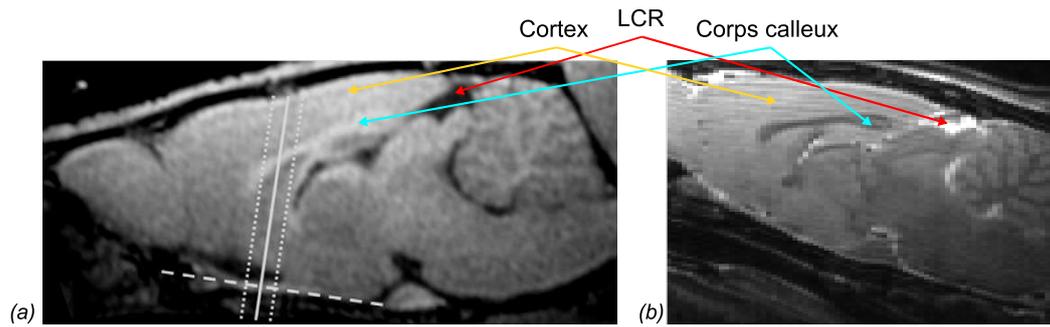


Figure 1.10 – (a) Vue sagittale d'une IRM de rat pondérée en T1 (d'après *Boretius et al. (2008)*) : le liquide céphalo-rachidien (LCR) apparaît en hyposignal, la matière grise (cortex par exemple) apparaît en hyposignal par rapport à la matière blanche (corps calleux par exemple). (b) Vue sagittale d'une IRM de rat pondérée en T2 (acquise à MIRCen) : les fluides apparaissent en hypersignal et les tissus mous ont des contrastes inversés par rapport au contraste anatomique T1.

Pour améliorer la qualité des IRM, des agents de contraste paramagnétiques peuvent être injectés avant l'acquisition. Perturbant la densité de protons de certains milieux (comme le liquide céphalo-rachidien), les T1 et les T2 concernés vont être altérés. Les structures affectées par l'agent de contraste vont apparaître différemment. Des opérations de traitement d'image peuvent aussi être appliquées aux données produites pour améliorer le contraste tissulaire (des exemples de ces améliorations de contraste tissulaire sont illustrés dans le chapitre 2 (p. 63)).

L'IRM est une modalité non ionisante et non invasive, qui va permettre de créer une image 3D de tous les organes, y compris ceux se trouvant dans une cavité osseuse comme le cerveau. Cette technique est par conséquent fréquemment utilisée dans les neurosciences. Notons que, contrairement à la TDM, cette imagerie n'est pas quantitative, *i.e.* que les intensités des pixels<sup>1</sup> de l'image créée ne renvoient pas directement à une grandeur physique.

Cette technique d'imagerie est aujourd'hui utilisée en routine chez l'Homme et offre des images de bonne résolution par rapport aux dimensions du sujet observé (résolution spatiale de l'ordre du millimètre). Pour observer par IRM des objets de plus petite taille, tels que le cerveau de rongeur, les scientifiques ont dû adapter ces systèmes en augmentant notamment le champ magnétique (typiquement 7 à 11,7 teslas) : ceci permet d'augmenter la sensibilité de détection. Typiquement, une acquisition IRM (*in vivo*) de 15 minutes donnera une image cérébrale de souris d'une résolution spatiale isotrope valant entre 100 et 200  $\mu\text{m}$ . Pour augmenter cette caractéristique, il faut accumuler plus de signal et donc faire une acquisition plus longue (plusieurs heures). Ceci peut être contraignant car pendant l'expérimentation, l'animal est anesthésié. Allonger la durée d'acquisition implique donc une dose plus importante d'anesthésiant injectée au sujet. Beaucoup de chercheurs travaillent donc sur des images acquises *post mortem*. Alors que les premières images étaient obtenues

1. Dans ce manuscrit, tout élément d'une image est désigné par *pixel* et ce, quelle que soit la dimension des données étudiées.

une fois l'organe extrait (*ex situ*) (Ma et al., 2005), les images actuelles sont acquises certes après l'euthanasie de l'animal, mais toujours *in situ*, *i.e.* dans leur environnement natif (le cerveau par exemple est laissé dans la boîte crânienne). Les déformations de type primaire (cf. paragraphe 1.2.1 (p. 9)) sont ainsi diminuées et la qualité des images d'autant plus améliorée (Johnson et al., 2007; Badea et al., 2007; Dorr et al., 2008).

### 1.2.2.3 Imagerie par Tomographie par Emission de Positons

La Tomographie par Emission de Positons (**TEP**) est une technique développée en 1975 qui permet de cartographier et quantifier la fixation d'un ligand dans l'organisme (Ter-Pogossian et al., 1975). Cette technique d'imagerie fonctionnelle quantitative, peu invasive mais ionisante, est considérée comme l'analogue *in vivo* de la technique *post mortem* "autoradiographie" (cf. paragraphe 1.2.1 (p. 9)).

Des radiotraceurs, comme le fluorodésoxyglucose marqué au fluor 18 ( $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ) sont injectés dans le sujet à étudier. Ils vont ensuite se fixer sur les cellules cibles ou être métabolisés par l'organisme. Dans l'exemple précédent, le radiotraceur est utilisé comme son analogue naturel, le glucose. Le radioisotope se désintègre dans l'organisme en émettant un positon qui, au contact d'un électron, va s'annihiler après un très court parcours. L'interaction de ces deux particules va émettre deux photons  $\gamma$  de 511 keV en sens opposés. S'ils sont détectés en coïncidence (à  $180^\circ$  et à quelques nanosecondes près) par des capteurs positionnés autour du sujet, le signal enregistré va permettre de retrouver la localisation de l'annihilation, très proche du positon émis par le radioisotope (cf. figure 1.11(a)). Pour cela, des techniques de reconstruction tomographique sont utilisées pour créer une image TEP tridimensionnelle dite d'*émission*.

Une fois émis, les photons peuvent rencontrer des particules avant d'être détectés. Ces interactions rayonnement-matière peuvent diminuer l'énergie des photons émis et ainsi diminuer le signal enregistré par les détecteurs et par conséquent le contraste de l'image produite. Ces interactions peuvent également dévier la trajectoire des photons. Ceux émis initialement en sens opposé après l'annihilation d'un positon avec un électron ne peuvent donc pas être détectés en coïncidence. A l'inverse, des photons, non émis initialement à  $180^\circ$  l'un de l'autre, peuvent être détectés en coïncidence de façon fortuite. Des méthodes de reconstruction et de correction ont été mises au point pour limiter le nombre des faux positifs créés par ces phénomènes physiques et apparaissant dans les images TEP.

Une illustration d'image TEP acquise sur un rat se trouve en figure 1.11(b). Cette représentation montre bien la principale limitation de cette modalité d'imagerie : l'absence de repères anatomiques. Seule, une image TEP est donc difficilement analysable. Il est recommandé d'acquérir une image anatomique (par exemple une image TDM ou IRM) sur le même sujet (la complémentarité des modalités est décrite en paragraphe 1.2.3 (p. 21)).

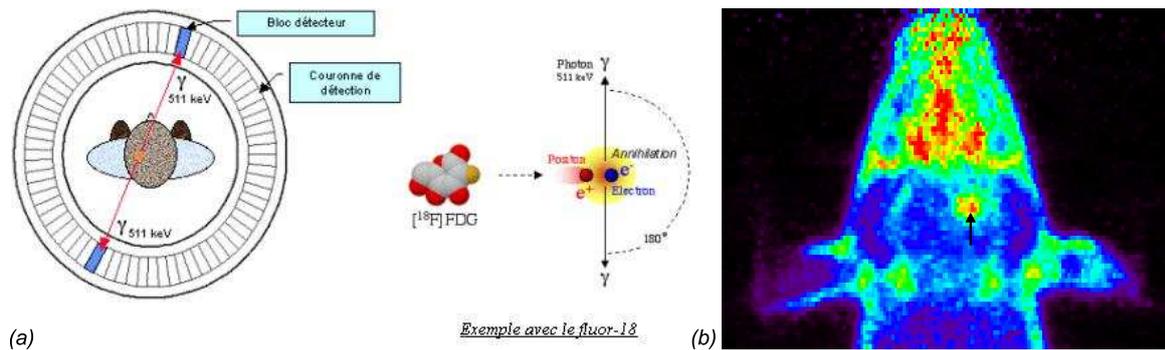


Figure 1.11 - (a) Principe de l'imagerie TEP : Un radiotracteur (exemple du  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ) est injecté. Le radioisotope se désintègre dans l'organisme en émettant un positon qui, au contact d'un électron, va s'annihiler. Deux photons  $\gamma$  de 511 keV vont être émis en sens opposés. S'ils sont détectés en coïncidence autour du sujet, le signal enregistré va permettre de retrouver la localisation du positon dans l'organisme. Source : <http://www.quantique.net/>. (b) Image TEP acquise sur un cerveau de rat. Nous remarquons l'absence de repères anatomiques. La flèche indique le striatum dans lequel le radiotracteur injecté s'est fixé. Cette image a été acquise par une équipe de MIRCen.

L'analyse d'une image TEP consiste à mesurer la quantité de radiotraceurs qui s'est effectivement fixée sur les cellules cibles. Pour l'évaluer, il faut au préalable modéliser la quantité de radiotraceurs disponible dans l'organisme, *i.e.* celle située dans les tissus (non quantifiable précisément) et celle circulant dans le système sanguin. Pour mesurer cette dernière grandeur, des prélèvements sanguins au niveau des artères peuvent être effectués au cours de l'examen (pour obtenir ce que l'on appelle communément une *fonction d'entrée*).

Ces prélèvements sont difficilement réalisables sur le petit animal. Cette intervention est très délicate sur le rat et encore plus complexe sur la souris du fait de sa plus petite taille. Les opérateurs ne peuvent donc pas quantifier exactement la quantité de radiotraceurs réellement fixée sur les cellules cibles. De plus, durant l'acquisition de l'image TEP, l'animal est anesthésié, contrairement à l'homme durant un examen clinique. Les produits anesthésiants étant susceptibles d'interagir avec le radiotracteur et les constantes physiologiques, l'interprétation de l'intensité de l'image TEP produite est d'autant plus complexe.

La résolution des images produites dépend en partie de la taille des détecteurs. Une caméra TEP développée pour le petit animal (usuellement appelée  $\mu\text{TEP}$ ) peut fournir des images avec une résolution plus fine que celle d'images TEP acquises chez l'homme ( $\sim 1,5 - 2$  mm pour un  $\mu\text{TEP}$  type Focus de chez Siemens contre  $\sim 3 - 4$  mm pour une caméra type Biograph de ce même fabricant). Cependant, si nous considérons le volume moyen d'un cerveau de souris ( $\sim 0,5 \text{ cm}^3$ ), la résolution des  $\mu\text{TEP}$  apparaît encore limitée pour étudier les régions cérébrales d'intérêt chez cet animal. Technologiquement, l'amélioration de la résolution des caméras a été obtenue aux dépens de la sensibilité de détection. Alors que cette grandeur est évaluée à près de 10 % sur un système clinique, elle diminue à près de 5 % sur un système dédié au petit animal. Pour détecter un signal correct, la quantité de radioactivité à injecter doit être, par rapport à la masse du sujet, plus importante chez

le petit animal que chez l'homme. Un compromis doit cependant être trouvé pour ne pas perturber le processus étudié (Hume et al., 1998).

### 1.2.3 Complémentarité des modalités d'imagerie

Le tableau 1.1 résume les principales caractéristiques des modalités d'imagerie présentées dans les paragraphes 1.2.1 (p. 9) et 1.2.2 (p. 15).

Modalité	Acquisition	Information	Résolution	Limitations
Autoradiographie	<i>Post mortem</i>	Fonctionnelle	$\sim 20 \mu\text{m}$	2D
Histologie	<i>Post mortem</i>	Anatomique	5 - 120 $\mu\text{m}$	2D
TDM	<i>In vivo</i>	Anatomique	quelques dizaines de $\mu\text{m}$	Pas de contraste tissulaire à l'intérieur d'une cavité osseuse
IRM	<i>Post mortem</i> / <i>In vivo</i>	Anatomique / Fonctionnelle	70 - 150 $\mu\text{m}$	Faible rapport signal sur bruit pour objets petites dimensions
TEP	<i>In vivo</i>	Fonctionnelle	1,5 - 2 mm	Absences de repères anat. et basse résolution

Tableau 1.1 – Caractéristiques de différentes modalités d'imagerie (autoradiographie, histologie, TDM, IRM, TEP) utilisées pour étudier le petit animal comme la Souris.

Malgré les avantages qu'offre l'imagerie acquise *in vivo*, les images produites souffrent d'une trop faible résolution au regard de la taille des structures observées chez le petit animal, notamment pour les études menées en neurosciences. Aussi, en dépit des limitations des modalités autoradiographique et histologique, ces **imageries acquises *post mortem* et *ex situ*** fournissant des images bidimensionnelles restent la **référence pour les biologistes** du fait de leur grande résolution et spécificité de marquage (Wong et al., 2002; Valla et al., 2006).

Les descriptions des modalités d'imagerie présentées dans le tableau 1.1 illustrent que, tant *post mortem* qu'*in vivo* il n'existe pas de modalité qui se suffise à elle-même pour réaliser une analyse à la fois anatomique et fonctionnelle quantitative, la plus complète possible. Chacune d'entre elles apporte une information différente et par conséquent complémentaire. Les scientifiques cherchent donc à obtenir, pour un même sujet, un maximum d'images multimodales et à les faire correspondre entre elles pour être en mesure de coupler les informations.

Il existe aujourd'hui des imageurs multimodaux pour l'imagerie *in vivo*, comme la caméra TEP-TDM Inveon de chez Siemens. Pour les études chez la Souris, ces appareils sont toujours en cours de développement (Fontaine et al., 2003; Delpierre, 2005; Liang et al., 2007). Ces combinaisons de modalités permettent de localiser plus précisément la biodistribution d'un traceur injecté dans l'animal. Cependant, la TDM ne pouvant différencier les structures cérébrales, l'utilisation d'une telle caméra ne peut suffire pour une étude en neuroanatomie. Le couplage d'informations fournies par la TEP avec celles produites par l'IRM serait plus approprié pour ces problématiques (Hammer, 1990; Hammer et al., 1994). Cependant, une telle association reste technologiquement délicate du fait de la difficulté de faire fonctionner à proximité d'un aimant haut champ, les chaînes d'acquisition nécessaires à un tomographe. De même, l'introduction d'une caméra TEP dans l'enceinte d'une IRM risquerait de perturber l'homogénéité du champ ; les images IRM seraient donc déformées ou souffriraient de lourds artéfacts. Malgré les récents progrès dans ce domaine (Marsden et al., 2002; Lucas et al., 2006; Raylman et al., 2006), la communauté scientifique se concentre plus sur une autre voie qui est la mise en correspondance *post* acquisition d'images obtenues à partir de différents systèmes. Les recherches sur ce sujet, décrites ci-après, visent par ailleurs à rapprocher les informations acquises *post mortem* de celles obtenues *in vivo*.

## 1.3 Mise en correspondance d'images

### 1.3.1 Recalage d'images

Mettre en correspondance, ou encore **recaler** une *image test* ( $I_{test}$ ) sur une *image référence* ( $I_{ref}$ ), consiste à estimer la transformation géométrique optimale qui permet d'aligner au mieux les images considérées. Cette opération peut être réalisée manuellement (Chan et al., 2007) mais est fastidieuse, opérateur-dépendant et peu reproductible. Des algorithmes ont alors été développés pour estimer mathématiquement la transformation optimale  $\hat{T}$ , appartenant à une classe de transformations géométriques  $\mathcal{T}$  et pouvant s'exprimer selon la formulation proposée dans Brown (1992) (cf. équation 1.1). Le but est de maximiser une mesure de ressemblance  $S$  pour apparier les pixels des deux images concernées, représentant des points physiquement homologues.

$$\hat{T} = \arg \max_{T \in \mathcal{T}} S(I_{ref}, I_{test}, T) \quad (1.1)$$

Selon la nature des images et les sujets observés, nous parlons de :

- **recalage monomodal**, si les images sont issues de la même modalité. Des différences morphométriques (recalage de volumes IRM anatomiques par exemple) ou fonctionnelles (recalage de données autoradiographiques ou d'images TEP par exemple) sont alors recherchées.
- **recalage multimodal**, si nous souhaitons mettre en correspondance deux images acquises *via* des techniques d'acquisition différentes ; c'est le cas par exemple quand on cherche à superposer l'information anatomique d'une IRM sur l'information fonctionnelle d'une image TEP.
- **recalage intra-sujet**, si les deux images ont été acquises sur le même sujet. Ce type de recalage est utilisé par exemple pour effectuer un suivi longitudinal d'un sujet, en comparant des images acquises à des temps différents.
- **recalage inter-sujet**, si nous cherchons à confronter des informations provenant de sujets différents. Ce type de recalage peut être effectué lorsque nous comparons, par exemple, une image d'un sujet "sain" à celle d'un autre "pathologique".

Le recalage est une problématique centrale en traitement d'images biomédicales : si elle échoue, l'analyse des images peut être biaisée, voire compromise car aboutissant à des conclusions biologiques ou médicales erronées. La complexité de sa mise en œuvre est d'autant plus importante que chaque situation est différente. Le recalage doit être adapté au cas par cas en fonction des modalités impliquées, des comparaisons éventuelles *in situ/ex situ*, voire *in vivo/post mortem* et des déformations géométriques à considérer.

La figure 1.12 propose une approche de classification des méthodes de recalage inspirée de celle proposée par [Maintz and Viergever \(1998\)](#). Chacun des termes utilisés sur cette figure est explicité dans la suite de cette section.

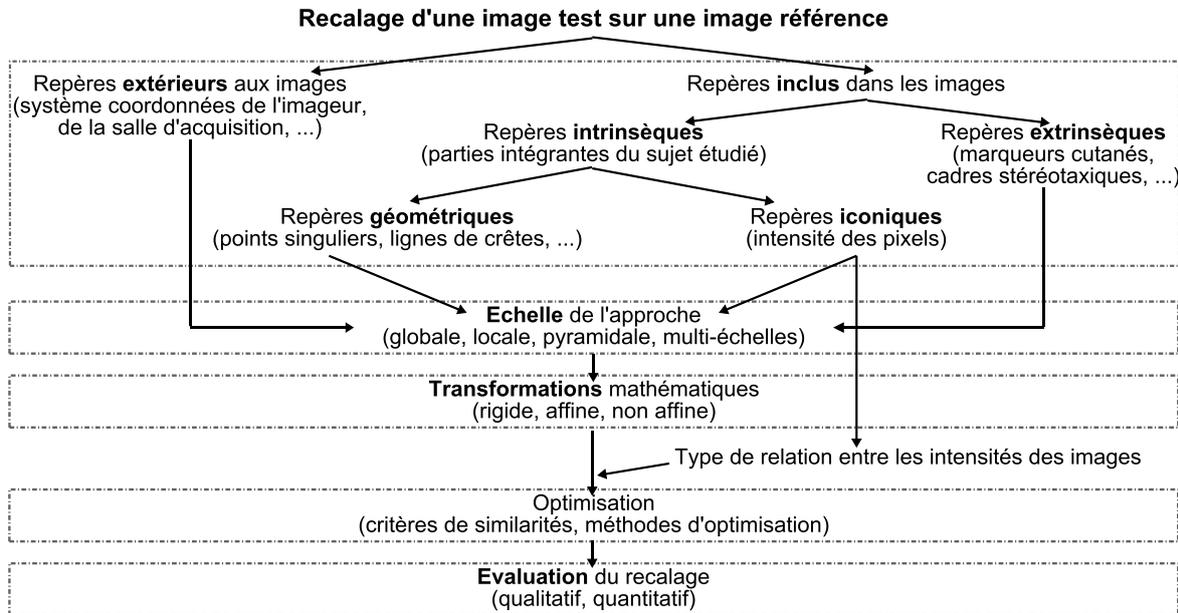


Figure 1.12 – Classification des méthodes de recalage d'images : un recalage d'images peut être basé sur des repères inclus ou non dans les images. S'ils sont inclus, ils peuvent appartenir ou non aux zones des images à mettre en correspondance (repères intrinsèques/extrinsèques). Un repère intrinsèque peut être de nature géométrique ou iconique. Le processus du recalage peut considérer la quasi totalité ou bien une partie seulement des images. Les transformations géométriques estimées sont affines ou non affines et optimisées par un critère de similarité. Enfin, des indicateurs qualitatifs ou quantitatifs permettent d'évaluer la qualité de la mise en correspondance des images.

## 1.3.2 Repères pour appairer les images

### 1.3.2.1 Repères inclus ou non dans les images

D'un point de vue général, le recalage de deux images peut s'opérer en utilisant deux types de repères : ceux extérieurs aux images et ceux qui en font partie. Les repères extérieurs aux images sont par exemple des systèmes de coordonnées propres au système d'acquisition des images (position du sujet à l'intérieur de la machine) ou à la salle accueillant la machine (repères par faisceaux laser). Ces références extérieures permettent de placer grossièrement le(s) sujet(s) dans une même position. Cependant, pour le recalage d'objets de très petites dimensions, tels que les structures cérébrales d'un petit animal, le résultat est trop approximatif pour être satisfaisant.

### 1.3.2.2 Repères extrinsèques ou intrinsèques

Pour avoir des repères plus adaptés aux recalages d'images acquises sur le petit animal, nous nous intéressons plutôt à ceux directement intégrés dans les images à recalcr. Ces derniers peuvent être extérieurs au sujet à étudier ; nous parlons alors de **repères extrinsèques**. Ceux-ci, plus ou moins invasifs, peuvent correspondre à des marqueurs cutanés (Evans et al., 1991), des marqueurs externes tels que des vis (Yelnik et al., 2007) ou encore des cadres stéréotaxiques (Lunsford, 1988). Développés pour certaines modalités, ces types de repères sont facilement détectables et ne gênent pas l'acquisition. Le calcul de la transformation géométrique peut donc être rapide. Cependant, le fait que ces repères soient souvent invasifs limite leur utilisation. Sur le petit animal, la fixation de vis ou de cadre stéréotaxique peut d'autant plus endommager la zone à étudier. Par ailleurs, le repère utilisé est invariant, en position, forme et constitution au cours des acquisitions, ce qui n'est pas forcément le cas du sujet observé. Prenons l'exemple de l'utilisation de barres d'oreilles ou des appareils pour bloquer la mâchoire d'un animal : ces dispositifs immobilisent le sujet et peuvent être positionnés de façon identique dans le système d'acquisition pour l'ensemble des expériences. Cependant, il est difficile de placer ces dispositifs sur les animaux et d'autant plus de manière identique. Les sujets étudiés ne sont donc pas positionnés exactement de la même façon dans le système d'acquisition. Recaler parfaitement des repères extrinsèques n'implique donc pas obligatoirement que l'objet étudié soit correctement recalé. Ainsi, les scientifiques se sont tournés vers des stratégies alternatives : l'utilisation de repères appartenant aux images et situés dans la zone d'intérêt. Dans ce cas, nous parlons de **repères intrinsèques**.

### 1.3.2.3 Point de vue géométrique ou iconique

Pour recalcr des images en se basant sur des repères intrinsèques à celles-ci, le problème peut être abordé d'un point de vue géométrique ou iconique.

Les repères **géométriques** (primitives géométriques) peuvent être des points singuliers de l'objet étudié (Thirion, 1996), des contours, des lignes de crêtes (Guéziec and Ayache, 1994), ou des surfaces (Borgefors, 1986). Les algorithmes d'appariement s'appuient sur une partie seulement de l'image et peuvent converger rapidement (quantité réduite d'informations à traiter). En revanche, cette approche implique que ces repères puissent être extraits des deux images impliquées dans le recalage, ce qui n'est pas forcément le cas si les images ont des artefacts ou sont issues de modalités d'imagerie différentes.

L'approche **iconique** prend en compte l'intensité des pixels de l'image : la mise en correspondance des images est basée sur la similarité relative, entre les niveaux de gris, des plus petits éléments constituant les images (les pixels). Les critères de similarité les plus utilisés pour recalcr deux images *via* cette approche sont décrits après. Ne nécessitant pas

d'opérations préalables d'extraction de primitives géométriques, l'approche iconique apparaît plus générale que l'approche géométrique. Pour trouver le meilleur appariement, une grande partie voire la totalité des pixels des images est prise en compte. Les algorithmes de mise en correspondance sont donc généralement plus complexes et coûteux en temps de calcul que ceux utilisés dans une approche géométrique.

### 1.3.3 Recalage par approches globales, locales, pyramidales et multi-échelles

#### 1.3.3.1 Approche globale, approche locale

L'opération consistant à recalcr deux images par une approche iconique peut prendre en compte, de façon séquentielle, une grande quantité (voire la quasi totalité) de pixels de l'image (parfois plusieurs millions). L'approche utilisée pour le recalage est alors dite **globale**.

Il est également possible d'adopter une **approche locale** qui consiste à considérer, indépendamment, des sous-parties des images (pouvant aussi être appelées *imagettes*). Un exemple de cette mise en correspondance par bloc est le recalage par "**Block Matching**" (BM). Initialement développée pour la compression vidéo, cette méthode a par la suite été adaptée pour reconstruire des volumes histologiques en appariant de proche en proche des images 2D (Ourselin et al., 2001). Cette approche permet de privilégier une sous-partie de l'image, ou au contraire d'en écarter certaines, considérées sans information pertinente pour le recalage. Cette dernière considération peut s'avérer très utile dans le cas d'un recalage de coupes histologiques ou autoradiographiques car les images peuvent présenter des artefacts inhérents au protocole d'acquisition (exemple du plissement de coupes qui peut modifier l'intensité et la géométrie d'une partie de l'image). Une description plus détaillée de cette approche est présentée en [annexe A \(p. 175\)](#).

#### 1.3.3.2 Approche pyramidale, approche multi-échelles

La courbe des coûts optimisée par rapport aux paramètres de la transformation géométrique peut s'avérer bruitée et irrégulière. Le risque que l'algorithme d'optimisation tombe dans un minimum local est alors accru. Pour contrecarrer ce risque, une **approche pyramidale** peut être employée : il s'agit d'estimer la transformation mathématique sur des images sous-échantillonnées pour capturer les principales déformations, puis d'itérer l'opération sur des images échantillonnées avec une plus grande résolution jusqu'à atteindre la pleine résolution.

Les transformations de recalage mises en jeu peuvent être estimées au niveau de points de contrôle répartis dans l'image (exemple de la transformation appelée *Free Form Deformation* présentée dans le paragraphe suivant). Pour optimiser l'appariement des images, l'opération de recalage peut être itérée, en augmentant progressivement le nombre de points de contrôle considérés : nous parlons alors ici d'un recalage estimé par une **approche multi-échelles**.

Ces approches permettent d'estimer des transformations de déformation avec un pas d'exploration variable. Les processus d'itération mis en place sur des données de plus en plus résolues ou sur des grilles de points de contrôles de plus en plus denses permettent également d'optimiser le temps de calcul global.

### 1.3.4 Classes de transformations

Pour mettre en correspondance deux images, différentes transformations peuvent être considérées. Elles sont souvent classées en deux grandes catégories : la catégorie des transformations affines et celle des non-affines. Les paragraphes suivants présentent les transformations utilisées dans ce projet de thèse.

#### 1.3.4.1 Transformations affines

Les transformations affines applicables à une image s'écrivent sous la forme de l'équation 1.2.

$$\forall X \in I_{test}, T_{aff}(X) = A.X + \vec{t} \quad (1.2)$$

où  $X(x_1, x_2, \dots, x_N)$  représente l'élément (pixel) de l'espace de dimension  $N$  des coordonnées spatiales de l'image  $I_{test}$  à recaler,  $N$  valant 2 en 2D, 3 en 3D ou 4 s'il s'agit d'une série d'images dynamiques TEP ;  $A$  est une matrice réelle de dimension  $N \times N$  et  $\vec{t}$ , un vecteur réel de dimension  $N$  symbolisant la **translation** appliquée. Le nombre maximum de degrés de liberté (ddl) d'une telle transformation est donc de  $ddl = N \times N + N$  ; soit 6 pour un espace en 2D et 12 pour un espace en 3D. Une transformation affine conserve le parallélisme et réciproquement.

La matrice  $A$  peut se décomposer en un produit de matrices de rotation (orthogonale et dont le déterminant vaut 1), d'homothétie (matrice diagonale à coefficients non nuls) et de cisaillement (matrice triangulaire inférieure à diagonale nulle). Si la matrice  $A$  n'est décrite que par des paramètres de rotation, alors il s'agit là d'une **transformation rigide**, ayant jusqu'à 3 ddl en 2D et 6 en 3D (voir figure 1.13(a)).

Le résultat de l'application d'une transformation affine en général sur un objet 3D est illustré en figure 1.13(b).

### 1.3.4.2 Déformations non affines

Le recalage de certaines images nécessite l'usage d'une transformation possédant un plus grand nombre de degrés de liberté, *i.e.* plus "flexible" qu'une transformation affine. Les transformations géométriques qui ne peuvent pas s'écrire sous la forme de l'équation 1.2 sont appelées transformations non affines, ou parfois transformations non linéaires par abus de langage.

Ces transformations non affines peuvent être définies par un nombre fini de paramètres (transformations paramétriques) ou au contraire par autant de vecteurs de déplacements qu'il y a de pixels dans l'image (transformations libres). Les algorithmes utilisés peuvent minimiser simultanément un terme d'attache aux données et une énergie de régularisation (**approche élastique**) ou optimiser alternativement ces deux termes (approche fluide). Cette dernière approche donne des résultats plus précis (localement) mais des déformations moins lisses.

Parmi les transformations élastiques, nous pouvons citer la transformation appelée "**Free Form Deformation**" (**FFD**), transformation paramétrique contrairement à ce que son appellation *free* laisse supposer. Pour déformer l'objet considéré, cette transformation s'appuie sur une grille constituée de  $p$  points de contrôle, répartis dans l'image et selon toutes ses directions. Sur chacun d'entre eux et pour chaque dimension est appliquée une fonction mathématique, pondérée par des coefficients  $C_{i,j,k} = (c_{i,j,k}^{x_1}, c_{i,j,k}^{x_2}, \dots, c_{i,j,k}^{x_N})$ , qui va permettre d'exprimer les vecteurs de déplacement en chaque point de l'image de façon continue (Sederberg and Parry, 1986).

Cette transformation a donc  $N \times p$  degrés de liberté pour déformer l'image  $I_{test}$  : si l'on considère par exemple une image 3D ( $N = 3$ ) et une grille ayant 10 points de contrôle selon chaque axe du référentiel ( $p = 10 \times 10 \times 10 = 1000$ ), la transformation FFD sera caractérisée par 3000 ddl, représentés par l'ensemble de coefficients  $C_{i,j,k}$ , associés à chaque point de contrôle de la grille et avec  $i, j, k$  définis par  $\forall i, j, k \in \mathcal{N}^3$ ,  $i, j, k \leq 10$  (dans notre exemple). Les fonctions  $\mathcal{B}$ -splines cubiques, fonctions polynomiales par morceau (Coquillart, 1990; Lee et al., 1997) sont souvent utilisées car elles possèdent de bonnes propriétés mathématiques (à support fini, de classe  $C^2$ ). Le champ de déplacement local ( $u, v, w$ ) est alors décrit par l'équation 1.3 :

$$\forall X \in I_{test}, T_{FFD}(X) = (x', y', z') = (x + u, y + v, z + w)$$

$$\text{avec } u = \sum_{l=0}^3 \sum_{m=0}^3 \sum_{n=0}^3 c_{i_0+l, j_0+m, k_0+n}^x \cdot \mathcal{B}_l(r) \mathcal{B}_m(s) \mathcal{B}_n(t) \quad (1.3)$$

avec  $\mathcal{B}$  les fonctions  $\mathcal{B}$ -splines cubiques,  $i_0 = \lfloor x/\delta_x \rfloor - 1$  et  $r = x/\delta_x - \lfloor x/\delta_x \rfloor$ , si  $\delta_x$  est l'espace entre deux points de contrôle et  $\lfloor \cdot \rfloor$  la fonction partie entière. Les indices  $j_0$  (respectivement  $k_0$ ) et  $s$  (respectivement  $t$ ) sont définis comme  $i_0$  et  $r$  en considérant  $y$  (respectivement  $z$ ) à la place de  $x$ . Les termes  $v$  et  $w$  sont également définis par l'équation 1.3, en remplaçant  $x$  respectivement par  $y$  et  $z$ .

L'utilisation de la FFD pour recaler des images, notamment médicales, a démontré tant son efficacité que sa robustesse à travers de nombreux travaux centrés sur l'imagerie du thorax humain (Bardinet et al., 1996; Rueckert et al., 1999; Mattes et al., 2003), mais aussi sur celle du cerveau d'animaux (Dauguet et al., 2007).

Le résultat de l'application d'une transformation non affine sur un objet en 3D est illustré en figure 1.13(c). Notons que l'estimation d'une transformation non affine pour mettre en correspondance deux images peut, la plupart du temps, être réalisée. Cependant, si l'objet d'intérêt est très déformé, la mise en correspondance des données peut ne pas être adaptée. Pour apprécier la pertinence du recalage effectué, les paramètres de déformation estimés peuvent être appliqués à une grille formée de plans perpendiculaires et régulièrement espacés entre eux et définie dans une matrice de taille équivalente à celle définissant l'image à recaler. Une évaluation qualitative permet ensuite de visualiser les zones de l'image les plus déformées.

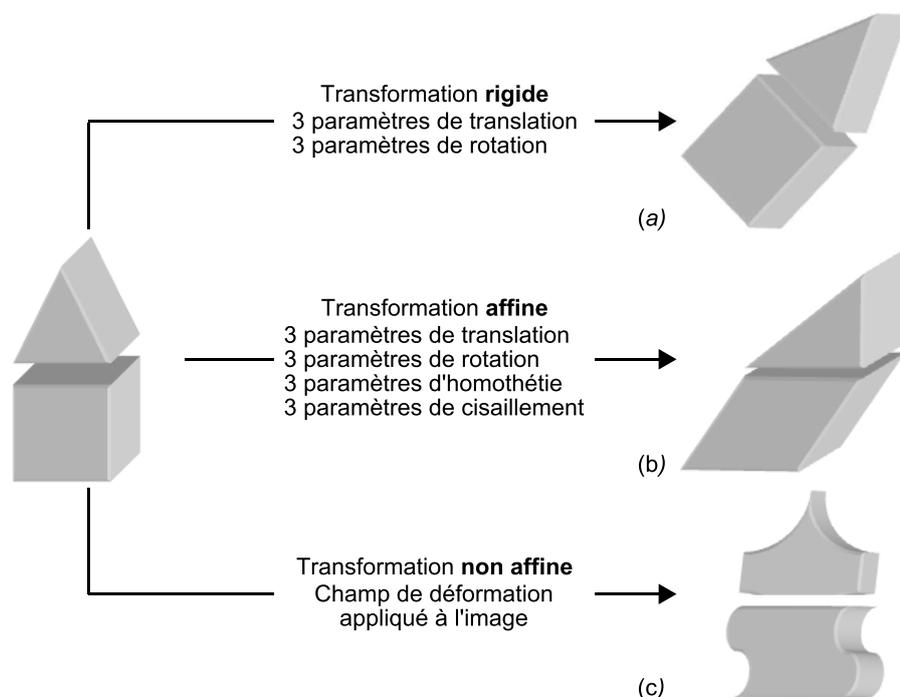


Figure 1.13 – Représentation de l'application de transformations rigides (a), affines (b) et non affines (c) sur un objet 3D.

## 1.3.5 Optimisation

### 1.3.5.1 Critères de similarité pour les appariements géométriques

#### *Mesure de distances*

Les critères de similarité utilisés pour les appariements géométriques s'appuient sur des **notions de distances**.

Parmi les mesures fréquemment optimisées, nous pouvons citer les distances euclidiennes, de Mahalanobis (Mahalanobis, 1936) et de Hausdorff. Cette dernière grandeur mesure l'éloignement de deux sous-ensembles d'un espace métrique (Huttenlocher et al., 1993; Rucklidge, 1996). Si nous considérons  $A$  et  $B$  deux sous-ensembles compacts non vides d'un espace métrique, alors la distance de Hausdorff  $D_H(A, B)$  entre  $A$  et  $B$  est définie comme étant le plus petit nombre réel  $r$  tel que tout  $r$ -voisinage d'un élément de  $A$  contienne un élément de  $B$  et tout  $r$ -voisinage d'un élément de  $B$  contienne un élément de  $A$ .

Une autre distance très utilisée en analyse d'images est la **distance du chanfrein**. Il s'agit d'une distance discrète basée sur un masque de pondérations entières, dont l'application locale permet le calcul de l'image de distance (Rosenfeld and Pfaltz, 1966; Borgefors, 1984). Si nous considérons  $p$  et  $q$  deux points d'un espace discret et le masque dit de chanfrein<sup>m</sup>  $\mathcal{M} = \{(\mathbf{x}_i, w_i)\}$  où  $\mathbf{x}_i$  est un déplacement et  $w_i$  un poids, alors la distance de chanfrein  $d_{\mathcal{M}}$  est le coût minimal  $\sum \lambda_i w_i$  de tous les chemins de longueur finie  $\sum \lambda_i \mathbf{x}_i$  entre  $p$  et  $q$  en utilisant  $\lambda_i$  fois (nombre entier) les déplacements  $\mathbf{x}_i$  du masque (voir équation 1.4).

$$d_{\mathcal{M}} = \min \left\{ \sum \lambda_i w_i \mid q = p + \sum \lambda_i \mathbf{x}_i \right\} \quad (1.4)$$

#### *Calcul d'une carte des distances*

Si nous considérons l'une des mesures précédemment citées, nous pouvons ensuite calculer des **cartes des distances**. Cette carte est associée à une image binaire de contours (en 2D) ou de surface (en 3D) tel que la valeur de tous les pixels appartenant aux contours/surfaces soit mise à zéro. La valeur de chaque autre pixel du restant de l'image représente la distance de ce pixel au point de contour le plus proche.

---

m. Un masque de chanfrein est un masque possédant une symétrie centrale, dont les poids sont strictement positifs et les déplacements non nuls.

### 1.3.5.2 Critères de similarité pour les appariements iconiques

Le choix du critère de similarité utilisé pour mettre en correspondance des images en s'appuyant sur la valeur de leurs pixels dépend essentiellement des éventuelles différences entre les modalités des images à appairer. En effet, les critères choisis sont différents suivant le type de relation existant entre les intensités des images.

En pratique, pour mettre en correspondance l'image  $I_{test}$  sur l'image  $I_{ref}$ , nous estimons le champ de ré-échantillonnage qui va de l'image  $I_{ref}$  à l'image  $I_{test}$ . Par souci de simplification d'écriture mathématique, nous confondons ce champ avec la transformation spatiale  $T$  permettant de recalcr l'image  $I_{test}$  sur l'image  $I_{ref}$ .

Nous notons pour la suite :

- $i = I_{ref}(X)$ , intensité du pixel  $X(x_1, x_2, \dots, x_N)$  dans l'image de référence ;
- $j = I_{test} \circ T(X)$ , intensité du pixel  $X(x_1, x_2, \dots, x_N)$  dans l'image test, une fois recalée par la transformation  $T$  ;
- $p_i$  et  $p_j$ , les probabilités d'obtenir  $i$  et  $j$ , respectivement dans l'image de référence et l'image test après recalage ;
- $p_{i,j}$ , probabilité qu'un pixel de l'image de référence ait l'intensité  $i$  et que son correspondant ait l'intensité  $j$  dans l'image test recalée.
- $p_{j|i} = \frac{p_{i,j}}{p_i}$ , probabilité qu'un pixel de l'image test recalée ait l'intensité  $j$  sachant que la probabilité que son correspondant ait l'intensité  $i$  dans l'image de référence soit non nulle.

#### *Relation de conservation des intensités*

Dans le cas de recalage d'images obtenues dans les mêmes conditions expérimentales, nous pouvons considérer qu'il existe une relation linéaire entre les intensités des pixels.

Lorsque l'hypothèse de conservation des intensités est vérifiée, une mesure classiquement utilisée pour optimiser une opération de recalage, notamment dans les études de [Zhao et al. \(1993\)](#) et [Hajnal et al. \(1995\)](#) du fait de sa simplicité de mise en œuvre, est la **somme des carrés de la différence**, ou *Sum of Squared Differences* (**SSD**) en anglais, définie par l'équation 1.5.

$$SSD(I_{ref}, I_{test} \circ T) = \sum_{i,j} (i - j)^2 \quad (1.5)$$

Cette mesure est par nature optimale (donc nulle) lorsque les intensités des pixels mis en correspondance des deux images sont identiques (conservation de l'intensité).

### Relation affine entre les intensités des images

L'hypothèse de la conservation des intensités peut s'avérer trop contraignante. Nous pouvons alors supposer qu'il existe une relation affine entre les intensités des deux images (Brown, 1992). La mesure la plus adéquate pour modéliser cette fonction mathématique est le **coefficient de corrélation** linéaire de Bravais-Pearson ( $\rho$ ), défini par l'équation 1.6.

$$\begin{aligned} \rho(I_{ref}, I_{test} \circ T) &= \frac{Cov(I_{ref}, I_{test} \circ T)}{\sqrt{Var(I_{ref}) Var(I_{test} \circ T)}} \\ &= \frac{\sum_{i,j} (i - \bar{I}_{ref})(j - \bar{I}_{test} \circ \bar{T})}{\sqrt{\sum_i (i - \bar{I}_{ref})^2 \sum_j (j - \bar{I}_{test} \circ \bar{T})^2}} \end{aligned} \quad (1.6)$$

avec  $Cov$  et  $Var$ , les fonctions covariance et variance, et  $\bar{I}$ , l'intensité moyenne de l'image  $I$ .

Ce coefficient varie de -1 à 1 : s'il est proche de 0, les variables impliquées (ici l'intensité de chacune des deux images) sont dites décorréllées linéairement. Optimiser ce critère de similarité équivaut donc à maximiser sa valeur absolue. Cette mesure est optimale lorsqu'il existe une relation affine entre les intensités des deux images considérées.

### Relation fonctionnelle entre les intensités des images

Dans certains cas de recalage d'images multimodales, la relation entre les intensités des images n'est pas affine, mais fonctionnelle. En se basant sur l'histogramme conjoint<sup>n</sup>, nous pouvons utiliser le **rapport de corrélation** ( $\eta$ ) défini par l'équation 1.7. Une étude détaillée sur ce critère a été réalisée par A. Roche (Roche et al., 1998; Roche, 2001).

$$\begin{aligned} \eta(I_{test} \circ T \mid I_{ref}) &= 1 - \frac{Var(I_{test} \circ T - E[I_{test} \circ T \mid I_{ref}])}{Var(I_{test} \circ T)} \\ &= 1 - \frac{\sum_i p_i (\sum_j p_j i j^2 - (\sum_j p_j i j)^2)}{\sum_j p_j j^2 - (\sum_j p_j j)^2} \end{aligned} \quad (1.7)$$

avec  $E$ , la fonction espérance. Ce critère est optimal lorsqu'il est maximisé.

n. Tableau 2D illustrant l'accumulation des couples d'intensités des images considérées pour le recalage. Une fois normalisé par le nombre de couples d'intensités, formé par les deux images, il représente la densité de probabilité jointe empirique qu'un couple d'intensités apparaisse.

*Relation statistique entre les intensités des images*

Dans d'autres cas de recalages multimodaux, les intensités à considérer ne sont plus liées par une relation linéaire mais plutôt par une relation statistique. En se basant une fois encore sur l'histogramme conjoint, nous pouvons utiliser l'**information mutuelle** ou *mutual information* (**MI**) en anglais, critère basé sur la mesure d'entropie de Shannon-Wiener en théorie de l'information et défini par l'équation 1.8.

$$MI(I_{ref}, I_{test} \circ T) = \sum_{i,j} p_{i,j} \log \frac{p_{i,j}}{p_i p_j} \quad (1.8)$$

Ce critère est optimal lorsqu'il est maximisé. Très largement utilisé dans le recalage d'images médicales multimodales (Collignon et al., 1995; Maes et al., 1997; Viola and Wells, 1997), il vise à intégrer des informations issues de différents systèmes, ce qui permet d'augmenter la valeur diagnostique en oncologie par exemple.

**1.3.5.3 Méthodes d'optimisation**

Pour trouver la meilleure transformation géométrique au sens d'un critère de similarité, plusieurs méthodes d'optimisation peuvent être utilisées. Celles utilisées pour ce projet de thèse sont décrites ci-dessous.

Lorsque cela est possible, on se sert d'une **approche analytique** car elle permet de trouver une solution par un calcul exact. Une méthode couramment utilisée est la **minimisation aux moindres carrés** des écarts entre les appariements initiaux et les déplacements induits par la transformation. Pour ce faire, la norme des résidus est définie par la norme euclidienne. L'avantage de cette méthode est l'existence d'une solution analytique pour les ensembles de transformations affines (Pennec, 1996). Pour pallier la sensibilité de cette approche aux points aberrants, des estimations successives de la transformation géométrique à optimiser peuvent être calculées en éliminant à chaque itération les points jugés trop loin de la solution (Rousseuw and Leroy, 1987). Pour déterminer les valeurs aberrantes, les appariements peuvent être classés par ordre de résidus croissants et ne sont conservés qu'un pourcentage des meilleurs résidus (typiquement 50 %).

Dans les cas où l'approche analytique n'est pas solvable, on utilise une **approche numérique** qui consiste à itérer l'approximation d'une solution jusqu'à la satisfaction d'un critère d'arrêt. Une autre approche très utilisée est celle de **Powell-Brent** (Powell, 1964). L'idée de base de cette méthode est d'optimiser séquentiellement les paramètres selon chacune des directions dans lesquelles ils sont décrits. Nous supposons qu'il existe un minimum global pour chaque paramètre selon chaque direction que nous pouvons déterminer par combinaison linéaire. L'avantage de cette approche est que le calcul du gradient du critère

n'est pas obligatoire (calcul parfois difficile sur tout l'espace). En revanche, la convergence vers un minimum global n'est pas garantie.

D'autres méthodes numériques comme celles dites de Quasi-Newton peuvent être utilisées pour résoudre des systèmes d'équations non-linéaires. Parmi elles, nous pouvons citer l'algorithme **L-BFGS** (acronyme de *Limited memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno*) décrit dans [Byrd et al. \(1995\)](#). Cette méthode consiste à approximer l'inverse de la dérivée seconde de la fonction à minimiser, en analysant les différents gradients successifs. Les paramètres estimés sont représentés dans seulement quelques vecteurs, approche particulièrement intéressante pour les problèmes traitant avec un grand nombre de variables.

### 1.3.6 Évaluation du recalage

La convergence de l'algorithme d'appariement des images signifie, dans le meilleur des cas, que le critère de similarité choisi a été maximisé. Ceci n'assure pas que les images soient correctement recalées. Il faut donc par la suite évaluer la qualité du recalage. Cette opération peut se faire qualitativement, et, sous certaines conditions, quantitativement.

#### 1.3.6.1 Évaluation qualitative du recalage

Pour s'assurer d'un bon appariement d'images, une possibilité intuitive consiste à fusionner (superposer) les images et observer si elles se recouvrent bien. Généralement, on s'appuie surtout sur des repères anatomiques facilement identifiables sur l'une et l'autre des images. L'application d'un algorithme d'extraction de contours sur l'une des deux images (souvent celle que l'on recalc), tel que celui proposé par Deriche ([Deriche, 1987](#)), permet de segmenter les contours des structures composant l'image concernée (cf. [paragraphe 1.4.2.2 \(p. 41\)](#)). La superposition d'une image de contours sur une image native peut aider à l'évaluation du recalage ([Mangin et al., 1994](#)). D'autres méthodes qualitatives existent comme celle qui consiste à découper les images en carrés (effet mosaïque) et à s'assurer de la continuité des objets d'un carré à l'autre.

Ces méthodes permettent de détecter d'importantes différences spatiales et géométriques entre les images. Cependant, ces évaluations sont peu objectives car inévitablement opérateur-dépendantes. Seules, elles permettent donc difficilement de comparer finement plusieurs méthodes de recalage ou une même méthode appliquée sur plusieurs jeux de données différents.

### 1.3.6.2 Évaluation quantitative du recalage

Pour avoir une évaluation quantitative du recalage d'une image sur une autre, nous pouvons avoir recours à des **critères de superposition** qui vont quantifier l'adéquation des images, en terme de taille, de forme et de recouvrement spatial (Zijdenbos et al., 1994; Gerig et al., 2001). Pour ce faire, il faut pouvoir extraire, de chacune des images, une segmentation<sup>o</sup> représentant la même région, comme une structure anatomique par exemple. Dans l'image de référence, nous appelons cette segmentation, **segmentation de référence** et dans l'image test, **segmentation test**. Après recalage, nous pouvons effectuer des mesures basées sur des notions de distance. Ces mesures permettent de bien comparer les petites segmentations mais sont sensibles aux éventuels artefacts risquant de perturber la forme globale des segmentations (Commowick, 2007).

L'autre possibilité est d'exploiter la quantité de pixels détectés par la segmentation test et de la comparer au nombre de pixels qui auraient dû être détectés (*i.e.* ceux appartenant à la segmentation référence). Nous appelons alors :

- **vrais positifs**, les pixels correctement détectés par la segmentation test ;
- **vrais négatifs**, les pixels correctement non détectés par la segmentation test ;
- **faux positifs**, les pixels détectés à tort par la segmentation test ;
- **faux négatifs**, les pixels non détectés à tort par la segmentation test.

Une illustration de ces termes se trouve en figure 1.14.

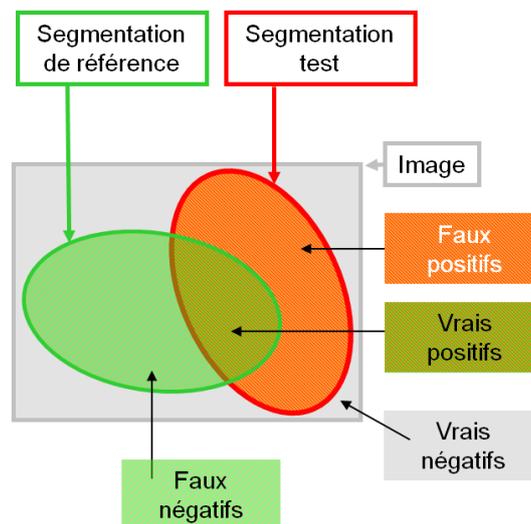


Figure 1.14 – Schéma représentant une segmentation de référence (en vert) superposée à une segmentation test (en rouge). Les pixels situés à l'intersection des deux segmentations sont les vrais positifs. Ceux appartenant à la segmentation de référence uniquement sont les faux négatifs et ceux n'appartenant qu'à la segmentation test sont les faux positifs. Ceux n'appartenant à aucune des segmentations sont les vrais négatifs.

<sup>o</sup>. Les sections 1.4 (p. 38) et 1.5 (p. 44) présentent différentes méthodes pour segmenter des images.

En désignant par  $R$ , la taille de l'image,  $S_T$  la segmentation test et  $V_T$  le volume lui correspondant (si nous travaillons en 3D),  $S_R$  la segmentation de référence et  $V_R$  le volume associé, nous pouvons alors calculer différents critères de superposition :

- **la différence de volumes**,  $\Delta_V$ , définie par l'équation 1.9 :

$$\Delta_V = 2 \times \frac{|V_T - V_R|}{V_T + V_R} \quad (1.9)$$

Ce critère permet de comparer l'écart volumique entre les deux segmentations. Si les deux régions ont exactement le même volume (condition optimale) alors ce critère est nul (cf. figures 1.15(a) et (c)).

- **le coefficient de Jaccard**,  $J$  défini par l'équation 1.10 comme le ratio entre les vrais positifs et l'union des deux segmentations.

$$J = \frac{\text{card}(S_T \cap S_R)}{\text{card}(S_T \cup S_R)} \quad (1.10)$$

avec  $\text{card}$ , le cardinal et  $\cap$  et  $\cup$  symbolisant respectivement les notions d'intersection et d'union.

Cet indice, proposé par Jaccard (Jaccard, 1901, 1912), introduit en traitement d'images des critères de superposition spatiale (cf. figure 1.15).

- **le coefficient de Dice**,  $\kappa$  défini par l'équation 1.11 comme le ratio entre les vrais positifs et la demie-somme des cardinaux des deux segmentations.

$$\kappa = 2 \times \frac{\text{card}(S_T \cap S_R)}{\text{card}(S_T) + \text{card}(S_R)} \quad (1.11)$$

Initialement proposé par Dice (Dice, 1945), ce coefficient quantifie de 0 à 1 la superposition spatiale des segmentations. Considérant que 1 correspond à une superposition parfaite, il est admis, dans la communauté scientifique, qu'un coefficient supérieur à 0,7 indique une bonne correspondance entre les deux segmentations (Zijdenbos et al., 1994). Etant lié au coefficient de Jaccard par la relation  $\kappa = 2 \times J / (1 + J)$ , nous pouvons alors considérer qu'un score  $J$  supérieur à 0,54 correspond à une bonne similarité entre les segmentations (cf. figures 1.15(b) et (c)).

- **la sensibilité** de la détection  $Se$  définie par l'équation 1.12 comme le ratio entre les vrais positifs et leur somme avec les faux négatifs :

$$Se = \frac{\text{card}(S_T \cap S_R)}{\text{card}(S_R)} \quad (1.12)$$

La sensibilité est un critère qui permet de quantifier l'efficacité d'une méthode de détection (apparentée dans notre exemple à la segmentation test). Une sensibilité élevée indique qu'il y a très peu de faux négatifs (cf. figures 1.15(b) et (c)).

A partir du moment où les segmentations dites *test* et *de référence* sont obtenues, il est possible de calculer les critères énoncés précédemment. Ces derniers renseignent quantitativement sur la qualité de la mise en correspondance des régions segmentées ainsi que sur la ressemblance des segmentations.

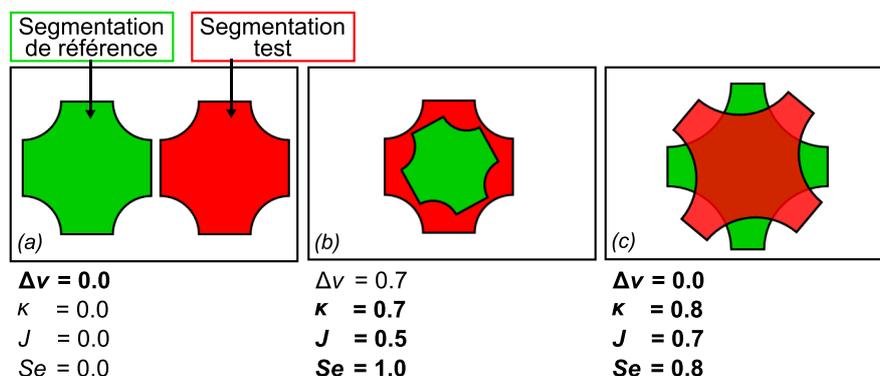


Figure 1.15 – Schéma illustrant différents scores obtenus pour les critères de superposition suivants : différence de volumes ( $\Delta V$ ), coefficient de Dice ( $\kappa$ ), coefficient de Jaccard ( $J$ ) et sensibilité ( $Se$ ). Dans la figure (a), les segmentations test et de référence ont la même taille mais ne se superposent pas : seule la différence de volumes est maximale. Dans la figure (b), la segmentation test est deux fois plus grande que la segmentation de référence et celle-ci est totalement intégrée dans la première : la sensibilité est donc maximale et les coefficients de Dice et de Jaccard attestent que les segmentations se superposent bien dans l'espace. Dans la figure (c), les deux segmentations ont la même taille et ne se superposent pas complètement dans l'espace. La différence de volumes est maximale et les trois autres critères attestent d'un bon recouvrement spatial des segmentations.

Pour mesurer la quantité de faux positifs, nous pouvons calculer la spécificité ( $Sp$ ) de la méthode, définie par le ratio entre les vrais négatifs et leur somme avec les faux positifs (cf. équation 1.13). Ce critère dépend de la taille de la boîte englobant les segmentations considérées. Pour les petites structures, il peut donc être très optimal (proche de 1), sans pour autant être probant pour évaluer le recalage d'images. Il faut donc prêter une attention particulière à son interprétation.

$$Sp = \frac{\text{card}(R \setminus S_T \cup S_R)}{\text{card}(R \setminus S_R)} \quad (1.13)$$

Le recalage d'images, notamment multimodales, permet donc d'associer plusieurs informations provenant de modalités différentes. Il devient alors possible d'analyser ces images en optimisant à la fois la pertinence de l'information extraite, la robustesse et le temps consacré à cette tâche. Les images acquises *post mortem* et *ex situ* restent, encore aujourd'hui, des images de référence pour les biologistes (cf. section 1.2 (p. 9)). Aussi, il est important de concentrer des efforts sur l'analyse de ce type d'images.

## 1.4 Méthodes d'analyse d'images 2D acquises *post mortem*

### 1.4.1 Approche classique d'analyse d'images 2D *post mortem*

#### 1.4.1.1 Numérisation des données

Les données acquises *post mortem*, de type autoradiographique ou histologique, se présentent sous forme de données bidimensionnelles (cf. [paragraphe 1.2.1 \(p. 9\)](#)). L'approche classique pour étudier ces données est de sélectionner quelques coupes et de les observer directement au microscope ou de les numériser, à l'aide d'un scanner à plat ou d'une caméra CCD<sup>p</sup>. Numériser ce type d'images est aujourd'hui très avantageux, car cela permet d'une part de stocker ces données et d'autre part d'offrir la possibilité à plusieurs opérateurs de les étudier à distance. Si les coupes marquées sont conservées à l'abri de toute source de détérioration possible, des numérisations à différente résolution peuvent être réalisées ultérieurement selon les besoins d'analyse.

L'acquisition de ces images numériques est réalisée en mode transmission. L'information de ces nouvelles données est donc une densité optique ( $DO$ ), fonction de la transmittance ( $T$ , rapport entre le niveau de gris moyen d'une zone de l'image et celui de son fond) :  $DO = -\log(T)$ . Pour convertir *a posteriori* la  $DO$  mesurée sur les coupes autoradiographiques en activité (nCi/g), des gammes étalons, appelés aussi standards d'activité, sont co-exposées avec les échantillons prélevés.

#### 1.4.1.2 Segmentation manuelle des images 2D

Des logiciels d'analyse d'images, type MCID<sup>TM</sup> Analysis, permettent par la suite de mesurer, sur une coupe autoradiographique dans notre exemple, la  $DO$  au sein d'une **région** définie ou **segmentée manuellement** par l'opérateur. Si des images anatomiques issues de marquages histologiques comme le violet de crésyl, ont été acquises sur les mêmes coupes que celles étudiées, les biologistes peuvent s'appuyer sur ces données pour identifier et segmenter les régions anatomiques d'intérêt où le radiotracteur s'est fixé. Un **atlas papier**, *i.e.* une succession de cartographies de l'organe concerné révélant des parfois plusieurs centaines de régions anatomiques, de type celui réalisé par Swanson ([Swanson, 1998](#)) ou par Paxinos et Franklin ([Paxinos and Franklin, 2001](#)), est utilisé pour guider les opérateurs dans leur travail d'identification de régions anatomiques (cf. [figure 1.16](#)). Ces dessins ont souvent été élaborés à partir de coupes prélevées selon le plan coronal (cf. [figure 1.4 \(p. 11\)](#)), perpendiculaire au plan inter-hémisphérique (cf. [figure 1.17](#)). Les régions segmentées sont

---

p. CCD, acronyme de *Charge-Coupled Device*, dispositif à transfert de charge.

repérées par leurs positions relatives par rapport à des points caractéristiques de la boîte crânienne (*bregma* et *lambda*). D'autres équipes superposent directement les diagrammes anatomiques numérisés sur leurs images 2D autoradiographiques (Morrow et al., 1998; Paulson et al., 2007).

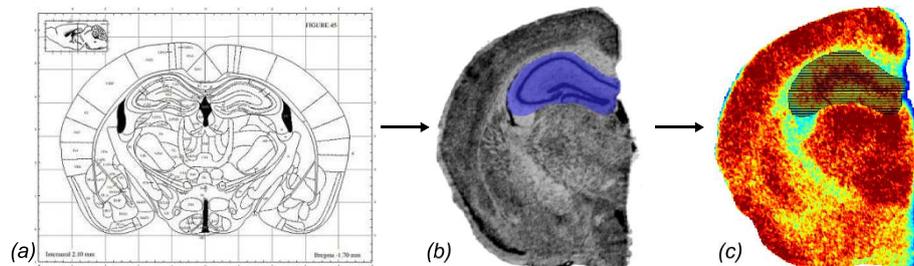


Figure 1.16 – Exemple d’atlas papier (a) ayant servi à délimiter manuellement l’hippocampe sur une coupe histologique (b), segmentation ensuite reportée sur la coupe autoradiographique correspondante (c). Cette segmentation sur ces données expérimentales a été réalisée pour l’étude décrite dans Lebenberg et al. (2010a).

### 1.4.1.3 Limitations de cette approche d’analyse

La segmentation manuelle est une approche d’analyse nécessitant l’intervention d’un expert en neuroanatomie. Elle est donc dépendante de la personne en charge de la segmentation. Même pour une personne entraînée, cette tâche reste longue et fastidieuse : il faut compter en moyenne 3 minutes pour segmenter correctement une région sur une coupe. Par ailleurs, les sections cartographiées dans l’atlas papier ne sont pas équidistantes tout au long de l’organe étudié. Les échantillons prélevés peuvent ne pas correspondre exactement aux coupes figurant dans l’atlas papier. Si de plus l’organe est positionné de biais sur le support, il a alors été sectionné dans un plan non perpendiculaire au plan inter-hémisphérique (cf. figure 1.17). La coupe prélevée n’est alors plus symétrique selon ce plan et il faut parcourir plusieurs planches de l’atlas pour pouvoir identifier l’ensemble des structures présentes sur l’échantillon.

Etant chronophage, ce type d’analyse ne permet d’explorer qu’un nombre limité de coupes et/ou de structures : une importante quantité d’informations, bien que présente sur ces images *post mortem*, demeure inexploitée. **Il faut donc optimiser l’intervention de l’opérateur en automatisant au moins une partie de l’analyse, voire en résolvant l’asymétrie des coupes prélevées.**

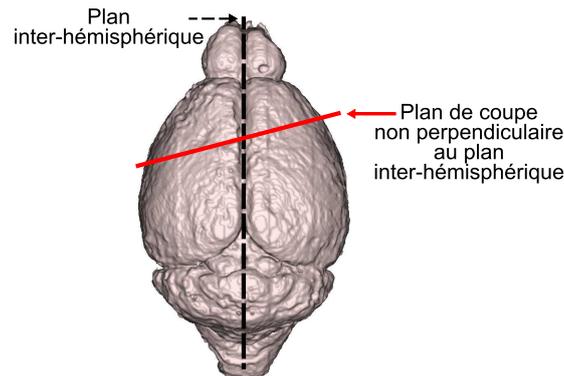


Figure 1.17 – Rendu surfacique d'un cerveau de souris avec son plan inter-hémisphérique (ligne pointillée). Si le cerveau est positionné de biais sur le support du cryostat, le plan inter-hémisphérique ne sera plus perpendiculaire au plan de coupe (ligne continue) ; la coupe prélevée ne sera pas symétrique par rapport au plan inter-hémisphérique. Son analyse sera plus fastidieuse.

## 1.4.2 Analyse semi-automatique

Quand un opérateur segmente manuellement une région sur des coupes fonctionnelles, il s'appuie sur des repères anatomiques mis en évidence sur d'autres images (atlas papier, coupes histologiques) et pertinents pour l'analyse qu'il souhaite mener. Le terme de segmentation intègre pour la personne en charge de cette tâche une notion d'extraction d'informations biologiquement pertinentes. Les algorithmes développés pour réaliser une analyse fonctionnelle semi-automatique doivent donc fournir des informations similaires.

En traitement des images, segmenter un objet est le procédé mathématique qui permet d'extraire cet objet de l'image à laquelle il appartient. Plus généralement, segmenter une image consiste à regrouper des pixels connexes ayant des propriétés communes qui les différencient des pixels des régions voisines (Horowitz and Pavlidis, 1975; Zucker, 1976). Il s'agit donc de déterminer des régions significatives pour cette image et qui regroupent des pixels homogènes entre eux. Pham *et al.* et Lecœur *et al.* ont présenté les différentes techniques de segmentation couramment utilisées en traitement d'images médicales (Pham *et al.*, 2000; Lecœur and Barillot, 2007). Avant de présenter quelques-unes de ces méthodes, nous synthétisons des caractéristiques des images 2D acquises *post mortem* dont il faut tenir compte pour déployer une technique d'analyse.

### 1.4.2.1 Caractéristiques des images 2D acquises *post mortem*

Les points suivants sont des caractéristiques des images histologiques et autoradiographiques importantes à considérer en vue d'une analyse réalisée semi-automatiquement. Ces images sont illustrées en [figure 1.7](#) (p. 9).

- le **cerveau** d'un petit animal (Rat, Souris) est lisse, *i.e.* **sans circonvolution**. Il existe donc moins de repères anatomiques que sur les cerveaux de primates.
- les **images autoradiographiques** sont dépourvues de repères anatomiques précis et sont très **bruitées**.
- les marquages histologiques de type **violet de crésyl** mettent en évidence certains types de cellules (corps cellulaires des neurones). Le contraste de l'image histologique est donc important au niveau de la cellule alors que les niveaux de gris sont assez similaires dans la plupart de structures anatomiques.

### 1.4.2.2 Méthodes de segmentation d'images semi-automatiques

Les techniques de segmentation d'images couramment utilisées en traitement d'images médicales sont les suivantes :

1. **Méthodes de seuillage** : ces méthodes font l'hypothèse qu'une région peut se démarquer des autres car l'intensité des pixels qui la constituent appartient à un intervalle qui lui est propre. Le risque principal encouru ici est un choix non optimal du ou des seuils entraînant des sur- ou sous-segmentations des objets recherchés. Des méthodes basées sur l'analyse d'histogramme de l'image peuvent aider à déterminer au mieux ces seuils ([Brummer et al., 1993](#)).
2. **Détection de contours** : ces méthodes s'appuient sur des primitives géométriques présentes dans les images. Il s'agit le plus souvent de contours des régions, *i.e.* des lignes de contrastes séparant des régions de niveaux de gris différents et relativement homogènes. Ces contours peuvent être déterminés en étudiant les variations d'intensité existantes au sein de l'image, autrement dit, en exploitant localement les *extrema* ou passages à zéro des gradients et laplaciens de l'image à analyser. Dans son étude, Deriche a proposé une méthode permettant de localiser les *maxima* du gradient de l'image selon une direction de l'opérateur ([Deriche, 1987](#)). Cette technique est considérée aujourd'hui comme une référence dans le domaine de la détection de contours.
3. **Croissance de régions** : cette approche consiste à agréger entre eux des pixels connexes dont l'intensité répond à un critère d'homogénéité permettant de définir une structure ([Haralick and Shapiro, 1985](#)). Parmi les méthodes connues s'appuyant sur ce principe, nous pouvons citer celle appelée *ligne de partage des eaux* qui consiste à considérer l'image à analyser comme un relief en associant le niveau de gris de chaque point à une altitude ([Digabel and Lantuéjoul, 1978](#)). La technique du *Fast Marching* peut, elle, segmenter des structures en utilisant un front de propagation ([Sethian, 1999](#)).

4. **Classification tissulaire en fonction d'une base d'apprentissage** : cette approche d'analyse consiste à répartir les pixels d'une image en plusieurs classes définies dans une base de données dite d'apprentissage. L'attribution d'une classe à chacun des pixels peut se faire par la méthode des *k-means* (MacQueen, 1967). Le principe de cette méthode est de partitionner au départ l'image en  $k$  ensembles, définis manuellement ou par une heuristique, qui vérifient localement des propriétés d'homogénéité, notamment en terme d'intensité lumineuse. Une autre méthode permettant de classifier les pixels d'une image dans des classes d'une base d'apprentissage est celle utilisant les *champs de Markov*, modèle statistique permettant d'attribuer un label (valeur arbitraire) à un pixel donné en fonction des valeurs prédéfinies dans les pixels alentours. Cette approche intègre donc la notion de répartition spatiale des pixels (Geman and Geman, 1984). L'attribution des labels peut se faire par une approche bayésienne qui va classifier chaque pixel dans une classe de structures définies selon la valeur du label la plus probable (Ali et al., 2005; Sharief et al., 2008; Bae et al., 2009).
5. **Méthodes basées sur des modèles déformables** : ces méthodes s'appuient sur des formes prédéfinies qui vont être capables de se déformer pour s'ajuster au mieux aux objets devant être segmentés. Nous parlons ici de modèles déformables et de contours actifs (Kass et al., 1988; Terzopoulos and Fleischer, 1988). Pour converger rapidement, la position initiale du modèle doit être proche de la solution. Ces méthodes sont en général utilisées pour ne segmenter qu'un objet à la fois.

L'ensemble des méthodes présentées dans le paragraphe précédent est sensible au bruit présent dans les images à analyser. Les appliquer sur des images autoradiographiques ne fournirait qu'une **extraction partielle des informations recherchées** (contours, régions) et donc **difficilement exploitables pour mener une analyse** de l'intégralité des données autoradiographiques. Par ailleurs, l'application de ces méthodes sur des images histologiques marquées au violet de crésyl ne permettrait d'extraire que les corps cellulaires des neurones du reste des images ou les zones délimitées par ces cellules (selon la résolution de numérisation des coupes). Il ne serait donc pas possible d'obtenir des segmentations fiables correspondant exactement à des structures anatomiques. Ces segmentations ne pourraient donc pas non plus analyser l'intégralité des données autoradiographiques correspondantes. Enfin, les méthodes nécessitant une initialisation (basées sur la croissance de régions, la méthode des *k-means* ou encore les contours actifs) sont très dépendantes de cette première étape et par conséquent peu reproductibles.

Nos recherches bibliographiques nous ont permis de découvrir d'autres approches d'analyses semi-automatiques développées principalement pour étudier des images tridimensionnelles telles que des images TEP ou IRM. Il s'agit de la **méthode d'analyse par comparaison statistique des intensités des pixels des images et de celle utilisant des atlas numériques 3D**. En plus de l'optimisation éventuelle de l'intervention d'un opérateur en charge de l'analyse des données *post mortem*, l'utilisation de l'une de ces méthodes implique la **nécessité de reconstruire en 3D les données** autoradiographiques et/ou histologiques acquises *post mortem*. Le problème d'asymétrie des coupes énoncé auparavant pourrait alors être résolu.

La section suivante présente des travaux menés pour reconstruire les données *post mortem* en 3D. Par la suite, les approches analyses semi-automatiques sus-citées seront détaillées.

## 1.5 Méthodes d'analyse d'images 3D acquises *post mortem*

### 1.5.1 Reconstruction 3D de données acquises *post mortem*

Le processus d'acquisition de coupes histologiques et autoradiographiques peut induire une asymétrie dans les données à analyser (cf. [paragraphe 1.4.1.3 \(p. 39\)](#)). Une façon de pallier ce problème est de reconstruire, en 3 dimensions, des volumes d'images à partir de séries de coupes prélevées. En effet, si nous cherchons maintenant à étudier un objet tridimensionnel et non plus un nombre limité d'images 2D, nous pouvons nous affranchir de la perte de symétrie due au protocole expérimental et considérer une quantité plus importante de coupes voire de structures à analyser. Il faut cependant recréer un objet spatialement cohérent et avec une géométrie proche de celle de l'organe natif (*i.e.* avant le processus de coupe).

De nombreux travaux concernant les méthodes de reconstruction de volumes à partir de coupes 2D ont déjà été réalisés notamment par Hess, Nikou, Malandain, Dubois et Dauguet ([Hess et al., 1998](#); [Nikou et al., 2003](#); [Malandain et al., 2004](#); [Dubois et al., 2007](#); [Dauguet et al., 2007](#)). Les paragraphes qui suivent présentent deux grandes approches adoptées en particulier par les personnes précédemment citées : l'approche de reconstruction d'images 3D recalant par propagation les coupes 2D les unes par rapport aux autres et l'approche de reconstruction d'images 3D recalant les coupes 2D sur des images de référence.

#### 1.5.1.1 Recalage intra-volume par propagation

Une façon de reconstruire un volume à partir d'images 2D est de positionner spatialement ces dernières de proche en proche. Il s'agit bien là d'un recalage même si les images prises en compte sont deux coupes successivement prélevées lors de l'expérience, donc deux objets différents. L'hypothèse sous-jacente est que les coupes à recaler sont proches et très semblables.

Les premiers travaux réalisés pour reconstruire algorithmiquement des volumes de données *post mortem* se sont appuyés sur des repères géométriques ([Hibbard and Hawkins, 1988](#)) ou iconiques ([Andreasen et al., 1992](#); [Nikou et al., 2003](#)) appartenant aux images 2D. L'utilisation de la méthode du Block Matching proposée dans [Ourselin et al. \(2001\)](#) et décrite en [annexe A \(p. 175\)](#) s'est révélée efficace pour reconstruire des volumes à partir de coupes (2D).

Cependant, le risque encouru lors de ce recalage intra-volume par propagation s'appelle l'*effet banane* (Streicher et al., 1997; Malandain et al., 2004) : la reconstruction tridimensionnelle d'un objet incurvé ne peut se faire qu'en se basant sur des repères propres à cet objet, la courbure perpendiculaire au plan de coupe étant perdue. Pour pallier ce problème, une solution proposée pour reconstruire les données *post mortem* a été d'utiliser un volume 3D de référence dont la forme des données n'a pas été détériorée par le processus d'acquisition de coupes (cf. paragraphe 1.2.1 (p. 9)). Dans ces conditions, les déformations secondaires ont pu être minimisées.

### 1.5.1.2 Reconstruction 3D par recalage avec un volume de référence

Pour reconstruire en 3D des données *post mortem*, les équipes de recherche ont principalement utilisé des volumes IRM ou bien des volumes photographiques, spécialement acquis pour résoudre le problème soulevé.

#### *Volume IRM considéré comme référence*

Pour reconstruire des volumes à partir d'images 2D de coupes histologiques prélevées, plusieurs équipes ont utilisé des volumes IRM acquis au préalable sur le même sujet. Ces images ont ensuite été ré-échantillonnées pour obtenir les sections 2D de l'IRM correspondant à celles prélevées *post mortem*. Des transformations linéaires (Schormann et al., 1995; Kim et al., 1997; Malandain et al., 2004) ou non linéaires (Chakravarty et al., 2006) sont ensuite appliquées aux coupes histologiques ou autoradiographiques numérisées. La difficulté de cette méthode est de trouver les bons appariements géométriques ou iconiques permettant de recalculer correctement les images. L'IRM (image 3D) n'offre en effet pas les mêmes détails ni contrastes structurels que des images histologiques ou autoradiographiques (images 2D). Ces dernières peuvent également souffrir d'artéfacts dus à l'acquisition et la manipulation des coupes (tissu déchiré, replié sur lui-même, ...). Il est donc difficile de mettre en correspondance ces modalités. De plus, dans la mesure où les coupes *post mortem* peuvent être asymétriques, elles peuvent correspondre à des plans obliques dans le volume IRM (Dauguet, 2005), ce qui ajoute une difficulté supplémentaire.

#### *Volume photographique considéré comme référence*

Pour s'affranchir de l'utilisation de l'IRM, une autre modalité est de plus en plus utilisée : la **photographie**. Il s'agit de photographier, à l'aide d'un appareil numérique ou d'une caméra vidéo, le plan de coupe de l'organe avant la coupe au cryostat (cf. figure 1.18). Si ces acquisitions sont réalisées exactement dans la même position tout au long des prélèvements, les images auront le même champ de vue. Étant acquises avant le processus de

coupe, ces données ne souffrent pas des déformations secondaires. L'empilement de telles images fournit donc directement un volume non affecté par l'effet banane et géométriquement cohérent dans l'espace. Pour chaque coupe prélevée, une photographie est associée. Correspondant physiquement à la même coupe, il est plus facile de recalcr une image de coupe histologique ou autoradiographique sur une photographie (recalage 2D-2D) que sur une IRM (recalage 2D-3D). Si les tissus prélevés ne sont pas trop abîmés et que les images numérisées ne présentent pas d'artéfacts importants, une transformation rigide peut suffire en première estimation (Bertrand and Nissanov, 2008; Dubois et al., 2010b).

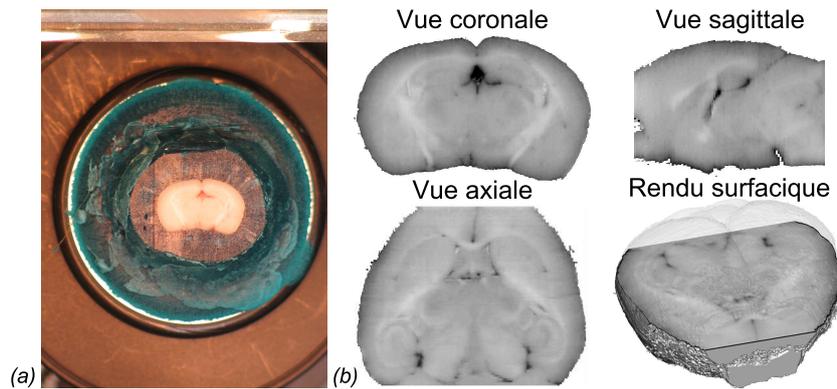


Figure 1.18 – (a) Photographie du plan de coupe avant la coupe au cryostat; (b) Illustration en incidences coronales, sagittales et axiales du volume photographique reconstruit et superposition d'une vue axiale avec le rendu surfacique de l'image 3D obtenue. L'image a été acquise sur un cerveau de souris, à MIRCen et le volume photographique a été reconstruit dans le cadre de l'étude Herard et al. (2009).

Dans l'étude Dauguet et al. (2007), les auteurs ont utilisé cette modalité pour reconstituer des volumes histologiques de cerveaux de primates pour lesquels les hémisphères s'étaient désolidarisés durant le processus de coupe. Cette modalité leur a également servi de passerelle pour recalcr ensuite le volume histologique sur le volume IRM acquis *in vivo* sur le même cerveau. Ainsi, cette équipe a obtenu un volume histologique présentant la même géométrie que celle des données acquises *in vivo*.

Dans l'étude Dubois et al. (2010b), les auteurs ont montré que l'utilisation de la photographie permettait de reconstruire et de recalcr entre eux des volumes histologiques et autoradiographiques de rongeur. La stratégie de reconstruction des volumes histologiques et autoradiographiques s'appuyant sur les images du volume photographique a fourni trois volumes parfaitement cohérents spatialement pour chaque animal. Une description plus approfondie de cette stratégie est présentée dans le manuscrit (en paragraphe 2.2.3 (p. 73)).

Nous venons de présenter une méthode permettant de résoudre le problème d'asymétrie limitant l'analyse des coupes histologiques et autoradiographiques : il s'agit de la reconstruction de volumes histologiques et autoradiographiques réalisée à partir de photographies numériques du plan de coupe. Cette modalité est cohérente avec les données à analyser,

notamment avec les autoradiographies. Si la méthode présentée dans [Dubois et al. \(2010b\)](#) est utilisée pour reconstruire un volume autoradiographique, ce volume fonctionnel pourrait être analysé à l'échelle des segmentations réalisées sur le volume photographique.

La photographie a été introduite il y a peu de temps dans le protocole d'acquisition de coupes de cerveaux de souris. Les études menées pour optimiser la qualité des photographies acquises, notamment pour améliorer le contraste tissulaire, ne sont pas nombreuses. Alors que ce contraste apparaît suffisant pour les études menées sur le Primate ou sur le Rat, il reste peu marqué pour les projets s'intéressant aux cerveaux de Souris. L'utilisation de méthodes de segmentation semi-automatiques telles que celles présentées au [paragraphe 1.4.2 \(p. 40\)](#) ne semble donc pas appropriée pour extraire des informations anatomiques des photographies acquises.

L'amélioration du contraste des photographies peut être réalisée grâce à l'utilisation d'un agent de contraste administré par perfusion comme cela a été proposé dans l'étude d'[Annese et al. \(2006\)](#). Cependant une analyse fonctionnelle par autoradiographie ne peut être réalisée après un tel protocole. Des efforts sont actuellement déployés au sein du laboratoire pour acquérir des photographies avec un contraste tissulaire de plus en plus important et augmenter tant la qualité que les champs d'application de la modalité photographique.

### 1.5.2 Analyse par comparaison statistique des intensités des pixels

Une autre approche d'analyse d'images, dite exploratoire, a émergé il y a une vingtaine d'années dans la sphère des neurosciences : il s'agit d'une méthode d'**analyse pixel à pixel** par comparaison statistique de groupes (souvent appelée *voxel-wise* ou *voxel-based* en anglais<sup>q</sup>). Initialement développée pour étudier des images TEP et IRM fonctionnelles acquises chez l'homme ([Friston et al., 1991, 1995](#)), elle a ensuite été utilisée pour analyser des images cérébrales IRM et TEP acquises *in vivo* chez le Rat ([Schweinhart et al., 2003](#); [Casteels et al., 2006](#)) puis, plus récemment, des volumes autoradiographiques chez ce même animal ainsi que chez la Souris ([Nguyen et al., 2004](#); [Lee et al., 2005b](#); [Dubois et al., 2008b, 2010b](#)). Cette approche consiste à comparer statistiquement des images de deux groupes de sujets distincts à l'échelle du pixel. Ceci permet de détecter des variations très faibles entre des groupes, difficilement accessibles avec d'autres méthodes d'analyses. Des variations contraires survenant au sein d'une même région anatomique peuvent être également détectées grâce à cette approche ([Poldrack, 2007](#); [Dubois et al., 2008b, 2010b](#)).

---

q. *Voxel* est la contraction de l'expression anglophone *volume element*. Il s'agit donc d'un pixel en 3D.

### 1.5.2.1 Principe d'analyse

Pour comparer statistiquement les intensités des pixels, il faut normaliser toutes les images de l'étude dans un référentiel commun puis décrire le modèle statistique permettant d'analyser les données. La **normalisation des données** est réalisée à l'aide de transformations affines et/ou non affines afin de corriger les différences inter-individuelles pouvant exister. Les variations inter-groupes fournies par l'analyse statistique reflètent ainsi les différences significatives. Le référentiel commun est en général celui d'une image moyenne représentant l'ensemble des données à étudier, aussi appelé *template* (cf. figure 1.19-1). A la fin de cette étape, les pixels homologues des images sont en correspondance les uns par rapport aux autres. Un lissage spatial de type gaussien est souvent utilisé pour renforcer l'étape de la normalisation spatiale et diminuer le bruit présent dans les images.

L'analyse statistique réalisée s'appuie sur un **modèle linéaire général** (cf. figure 1.19-2), modèle exprimant le signal observé en un pixel comme une combinaison linéaire de variables dites *explicatives* auxquelles s'ajoute une erreur résiduelle (Friston et al., 2007). Les variables explicatives sont les covariables (caractéristiques) du modèle (population d'appartenance à un groupe, âge, sexe, ...) définies pour chaque sujet impliqué dans le modèle et pondérées par un coefficient propre. Ce modèle peut donc s'écrire selon l'équation 1.14.

$$y = X\beta + \varepsilon \quad (1.14)$$

en désignant par  $N$ , le nombre d'images à analyser (on a généralement une image par sujet) et  $p$ , le nombre de régresseurs du modèle ( $p \ll N$ ), nous notons également :

- $y$ , vecteur colonne de dimension  $N$  représentant le signal observé en chaque pixel des images recalées dans le référentiel choisi ;
- $X$ , matrice dite d'*expérience* (ou *Matrix Design* en anglais) de dimension  $N \times p$  représentant les composantes attendues pour l'ensemble des sujets de l'étude ;
- $\beta$ , vecteur colonne de dimension  $p$  représentant les contributions de chacun des régresseurs pour le pixel observé ;
- et  $\varepsilon$ , vecteur colonne de dimension  $N$  représentant les résidus, supposés indépendants et identiquement distribués selon une loi normale  $\mathcal{N}(0, \sigma^2)$ , avec  $\sigma^2$ , la variance résiduelle.

L'analyse pixel à pixel par comparaison statistique consiste alors à estimer les paramètres  $\beta$  de ce modèle pour pouvoir ensuite les considérer comme données dans un test statistique établi pour comparer les groupes de sujets. L'estimation de ces paramètres, représentée par un vecteur noté  $\hat{\beta}$ , est obtenue en minimisant l'erreur  $\varepsilon$  par la méthode des moindres carrés. La solution obtenue est alors de la forme de l'équation 1.15.

$$\begin{aligned}\hat{\beta} &= (X^T X)^{-1} X^T y \\ \hat{\sigma}^2 &= \frac{\varepsilon^T \varepsilon}{N - p}\end{aligned}\tag{1.15}$$

avec  $X^T X$  matrice définie positive et  $\hat{\sigma}^2$ , l'estimée de la variance résiduelle. D'après la loi de Fisher,  $\hat{\beta}$  et  $\hat{\sigma}^2$  sont indépendants. Le **test statistique** réalisé par la suite est lié à une notion de **contraste**, représentée sous forme de vecteur colonne  $c$  de dimension  $p$  et dont chaque élément va permettre de peser les effets de certaines conditions à travers le scalaire  $c^T \beta$  en utilisant l'équation 1.16.

$$\frac{c^T \hat{\beta} - c^T \beta}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 c^T (X^T X)^{-1} c}} \sim t_{N-p}\tag{1.16}$$

avec  $t_{N-p}$ , la distribution de Student à  $(N-p)$  degrés de liberté. L'hypothèse  $\mathcal{H} : c^T \beta = d$  peut ensuite être évaluée en calculant les valeurs  $T$  définies par l'équation 1.17 et les  $p$ -values associées et ce, pour tous les pixels des images de l'étude. Une représentation graphique sous forme de cartographie de l'ensemble de ces  $T$  est ensuite créée, reflétant ainsi spatialement les effets du contraste choisi. Cette **image paramétrique** est appelée "carte des  $T$ " et illustre ainsi les différences testées entre les groupes. Des inférences statistiques sont ensuite introduites pour interpréter les résultats. Très souvent, elles consistent à ne considérer que les zones de l'image paramétrique dont l'intensité correspond à une  $p$ -value inférieure à un seuil de significativité accepté et tel que ces zones soient constituées d'un nombre minimal de pixels connexes. Les agrégats de pixels respectant ces conditions sont alors appelés des **clusters** (cf. figure 1.19-3).

$$T = \frac{c^T \hat{\beta} - d}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 c^T (X^T X)^{-1} c}}\tag{1.17}$$

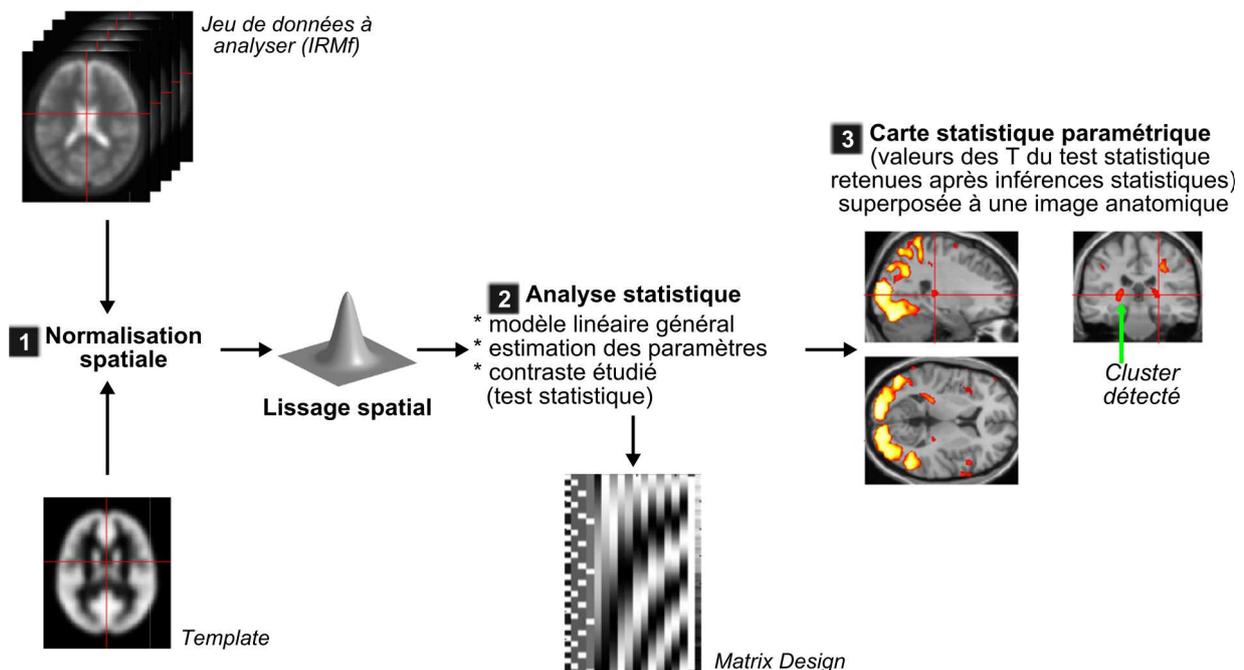


Figure 1.19 – Principe de l'analyse pixel à pixel par comparaison statistique (d'après *Friston et al. (2007)*). 1 : Les données sont d'abord normalisées spatialement dans un référentiel commun (généralement celui d'une image moyenne représentative du jeu de données aussi appelée template) pour corriger les différences inter-individuelles et faire correspondre les pixels des différentes images entre eux. Un lissage spatial est souvent utilisé pour diminuer le bruit présent dans les images. 2 : Le signal observé en chaque pixel des images normalisées est alors estimé selon un modèle statistique paramétrique représenté par une matrice ("matrix design"). 3 : Les résultats sont représentés sous forme de clusters issus d'une carte statistique paramétrique.

### 1.5.2.2 Logiciels dédiés

Les étapes de normalisation spatiale et d'analyse statistique sont souvent réalisées à l'aide d'un même logiciel créé pour ce type d'analyse (exemple : **Statistical Parametric Mapping** (SPM) développé au Wellcome Department of Imaging Neuroscience de Londres ; FMRIB Software Library (FSL) développé à l'Oxford Centre for Functional MRI of the Brain ; Analysis of Functional NeuroImages (AFNI) développé au Medical College du Wisconsin ; A general statistical analysis for fMRI data (FMRISTAT) développé au Department of Mathematics and Statistics de l'Université de McGill à Montréal). Ces logiciels ont initialement été paramétrés pour réaliser des études cliniques, *i.e.* pour traiter des images acquises *in vivo* chez l'Homme, dans le domaine des neurosciences.

L'application de ces techniques pour les études *in vivo* des cerveaux de rongeurs est complexe à réaliser du fait de la taille réduite de ces derniers et des limitations des systèmes d'acquisitions (en particulier en TEP). Pour l'étude du métabolisme du glucose, plusieurs travaux récents ont appliqué ces techniques d'analyse sur des images autoradiographiques reconstruites en 3D en utilisant le logiciel SPM. Pour réaliser ces études dans ce logiciel, un ré-échantillonnage préalable des données a été nécessaire.

Pour éviter ce ré-échantillonnage artificiel, Sawiak *et al.* ont récemment adapté les fonctionnalités de SPM aux dimensions et à la résolution des images cérébrales acquises chez le Rongeur et rebaptisé le logiciel **SPMMouse**. Ces nouvelles fonctionnalités, impactant notamment la normalisation des données de rongeurs, ont permis de mener une étude morphométrique sur des souris transgéniques modélisant la maladie de Huntington<sup>r</sup> (Sawiak *et al.*, 2009). L'analyse de ces données est basée sur le principe de la "Voxel Based Morphometry" d'après les travaux d'Ashburner *et al.* (Ashburner and Friston, 2000).

### 1.5.2.3 Limitations de cette approche d'analyse

Basée sur des comparaisons statistiques entre plusieurs groupes, cette approche d'analyse concerne les projets incluant un **nombre important de sujets** (typiquement une dizaine de sujets par groupe pour une étude clinique et entre six et huit pour une étude sur le Rongeur).

Par ailleurs, la localisation des différences inter-groupe mises en évidence par les cartes paramétriques générées se réfère à l'espace du *template* utilisé pour la normalisation des données à analyser. Pour les études cliniques, plusieurs équipes ont créé et mis à disposition de la communauté scientifique des modèles de cerveaux humains dont les coordonnées des pixels sont connues et renvoient à des zones cérébrales référencées comme l'atlas de Talairach (Talairach and Tournoux, 1988; Lancaster *et al.*, 2000) ou le *template* créé par le Montreal Neurological Institute (MNI) (Collins *et al.*, 1994).

Dans les études menées sur le petit animal, des *templates* appropriés ont dû être créés pour normaliser les images de cerveaux de rongeurs. Un descriptif sur la création d'un tel *template* est présenté plus loin dans le manuscrit (cf. paragraphe 4.1.1 (p. 117)). Ces modèles moyens de cerveaux de rongeurs ont permis de mener des études pré-cliniques. Cependant, les coordonnées des pixels ne sont plus liées à des zones cérébrales déterminées. Pour leurs études menées sur le Rat, Schweinhardt *et al.* et Casteels *et al.* ont pris pour centre du référentiel le point caractéristique de la boîte crânienne *bregma* et extrapolé les coordonnées des autres pixels de l'image en fonction de ce dernier (Schweinhardt *et al.*, 2003; Casteels *et al.*, 2006). Cette tâche requiert une localisation visuelle de ce point référent, moyennant une projection pour le situer sur le cerveau, rendant ainsi ce repère imprécis (Chan *et al.*, 2007). L'ensemble des coordonnées des pixels des images étudiées, et *a fortiori* le repérage des structures anatomiques, restent donc approximatifs. Les **clusters** résultant de l'analyse doivent donc être **localisés visuellement**, *i.e.* en les superposant à une image anatomique (Sawiak *et al.*, 2009).

---

r. La maladie de Huntington est une affection héréditaire due à une dégénérescence entraînant une atrophie du cortex cérébral et des ganglions de la base.

Enfin, une dernière limitation de cette approche d'analyse réside dans la méthode et donc l'interprétation des résultats obtenus. En effet, l'obtention des *clusters* représentant les différences mises en évidence entre les groupes dépend du seuil de significativité choisi. Si nous considérons une  $p$ -value égale à 0,01, nous pouvons nous attendre à détecter  $0,01 \times n$  faux positifs,  $n$  étant le nombre total de pixels détectés positifs au test statistique. C'est ce que l'on appelle le **problème des comparaisons multiples**. Il faut alors trouver des corrections pour diminuer ce nombre de faux positifs. Parmi elles, il existe la correction de Bonferroni qui admet pour seuil de significativité le ratio de celui-ci par le nombre de tests effectués (Miller, 1981). Cependant, cette dernière correction se révèle trop conservatrice pour un nombre important d'études en neuroimagerie fonctionnelle du fait de la corrélation spatiale de l'intensité d'un pixel avec celles des pixels des alentours (conséquence de la reconstruction des données, des normalisations et des lissages appliqués). Pour s'affranchir du caractère conservatif de cette correction sur des images lissées, Worsley *et al.* ont proposé d'utiliser la *Random Field Theory* et de restreindre l'analyse statistique à une sous-partie des images, approche connue sous le nom de **Small Volume Correction** (Worsley *et al.*, 1996). Enfin, dans le cas d'une étude n'observant qu'un petit nombre de sujets, l'approche du **False Discovery Rate (FDR)** (Benjamini and Hochberg, 1995) est conseillée (Frackowiak *et al.*, 2003). Celle-ci consiste à contrôler le nombre de faux positifs parmi le nombre de pixels déclarés positifs par l'analyse statistique. Par la suite, Genovese *et al.* ont préconisé d'appliquer la correction du FDR, à des sous-parties isolées afin d'écartier tous les tests dont nous connaissons le résultat par de précédentes hypothèses (Genovese *et al.*, 2002). Il est donc intéressant de trouver une méthode capable de segmenter les parties des images susceptibles de contenir les différences les plus significatives entre les groupes de l'étude.

### 1.5.3 Analyse par atlas numérique 3D

A la différence de ceux présentés au paragraphe 1.4.1 (p. 38), les atlas concernés dans ce paragraphe sont numériques et les structures segmentées ne réfèrent pas à des coordonnées stéréotaxiques. Il s'agit donc de modèles numériques cartographiant les organes étudiés. Les régions segmentées sont représentées par une valeur de pixel arbitraire (label), ne correspondant pas à un phénomène physique particulier. Le principe de l'approche d'analyse présentée ici, appelée par la suite **approche atlas**, est de **segmenter simultanément plusieurs structures sur une seule et même image** en se référant à celles prédéfinies dans l'atlas numérique utilisé. Cette approche consiste donc à mettre en correspondance un modèle numérique avec une image qualifiée d'*expérimentale*. Généralement, l'atlas est obtenu à partir de la segmentation d'une image en plusieurs régions (typiquement une ou plusieurs dizaines). Les méthodes de construction d'un atlas sont détaillées dans le prochain paragraphe.

Dans un premier temps, l'image utilisée pour segmenter l'atlas est mise en correspondance avec l'image à étudier. Dans un second temps, la transformation précédemment estimée est appliquée à l'atlas pour analyser l'information de l'image expérimentale ou obtenir des propriétés morphologiques de cette dernière (cf. figure 1.20). Cette approche introduit en plus d'un *a priori* de forme sur les objets à extraire des images, un *a priori* sur leur localisation spatiale les uns par rapport aux autres. Elle a l'**avantage de permettre l'analyse d'une unique image**, contrairement à l'analyse par comparaison statistique (cf. paragraphe 1.5.2 (p. 47)) qui requiert de travailler sur des groupes d'images. De plus, l'image expérimentale est analysée **dans sa géométrie native**, *i.e.* sans normalisation spatiale préalable.

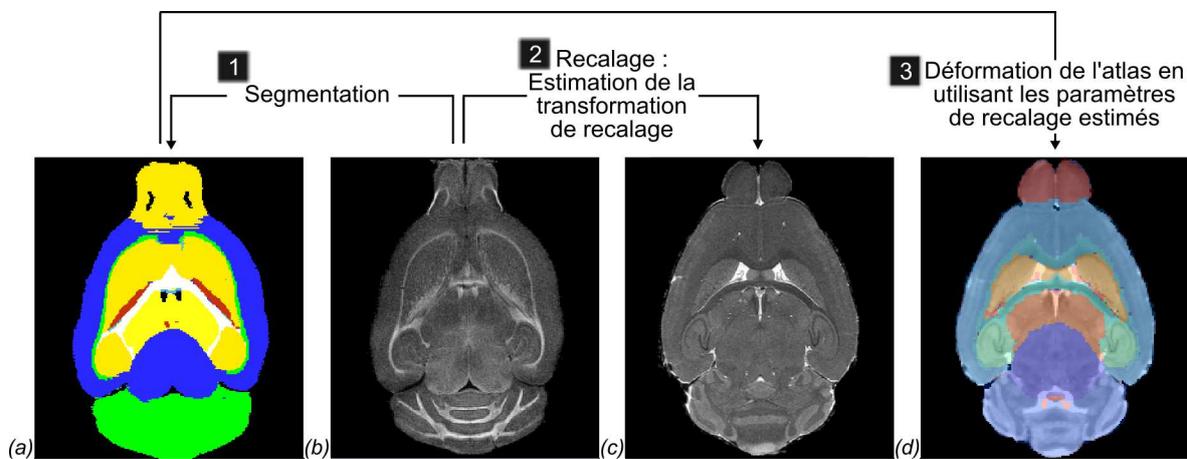


Figure 1.20 – Schéma de principe de l'analyse par atlas numérique : 1) Création d'un atlas (a) à partir d'une image (b) ; 2) Estimation de la transformation géométrique permettant de recalculer l'image (b) sur l'image à analyser (c) ; 3) Déformation de l'atlas (a) en utilisant les paramètres de recalage estimés pour pouvoir appliquer les segmentations de l'atlas (a) sur l'image à analyser (c) ; image de fusion (d) de l'atlas (a) et de l'image à analyser (c).

Les atlas présentés ci-après sont ceux utilisés dans le cadre des neurosciences et exploités pour la recherche sur le Rongeur.

### 1.5.3.1 Construction d'un atlas numérique 3D

La construction d'un atlas numérique peut être réalisée de plusieurs façons :

- à partir de segmentations manuelles réalisées sur une ou plusieurs images expérimentales 3D ;
- à partir de segmentations issues d'un atlas papier numérisé ;
- à partir de segmentations semi-automatiques réalisées sur une ou plusieurs images 3D.

*A partir de segmentations manuelles réalisées sur une ou plusieurs images 3D*

Un atlas numérique 3D peut être construit à partir de segmentations manuelles d'image(s) 3D réalisées par un expert en neuroanatomie. Pour ce faire, ce dernier s'appuie, comme pour les segmentations sur coupes (cf. [paragraphe 1.4.1 \(p. 38\)](#)), sur des atlas papiers ([Swanson, 1998](#); [Paxinos and Franklin, 2001](#)). Les délimitations de structures sont réalisées par l'intermédiaire de la souris de l'ordinateur ou de tablettes graphiques et de logiciels appropriés (Anatomist, logiciel développé à l'I<sup>2</sup>BM du CEA ([Rivière et al., 2003](#)) ; Amira, Mercury Computing Systems, San Diego, CA ; Display, logiciel développé par le McConnell Brain Imaging Center du Montreal Neurological Institute ; ImageJ, MRPath, Durham, NC ; Illustrator, Adobe ; ...).

L'opérateur en charge des tracés travaille sur les données anatomiques tridimensionnelles qu'il possède. Dans la plupart des travaux proposés, il s'agit de données acquises en IRM ([Kovacević et al., 2005](#); [Dorr et al., 2007, 2008](#); [Scheenstra et al., 2009](#)). Bertrand *et al.* ont quant à eux réalisé leurs segmentations sur un volume histologique (segmentation selon le plan de coupe axial) ([Bertrand and Nissanov, 2008](#)). Rubins *et al.* ont eux choisi de s'appuyer sur des photographies pour définir leurs tracés ([Rubins et al., 2003](#)). Certains utilisent plusieurs modalités d'imagerie pour améliorer les tracés en exploitant les informations complémentaires. Ainsi, Mackenzie-Graham *et al.* se sont appuyés sur les coupes histologiques acquises après l'IRM pour délimiter plus précisément les petites structures cérébrales ([Mackenzie-Graham et al., 2004](#)). Dorr *et al.*, ainsi que Chan *et al.* ont quant à eux utilisé des images TDM pour les guider dans l'élaboration de leur atlas du système vasculaire cérébral de la Souris ([Dorr et al., 2007](#)) ou dans le développement de repères stéréotaxiques en 3D ([Chan et al., 2007](#)).

Délimiter manuellement des structures anatomiques permet de segmenter le cerveau selon les objectifs de l'opérateur (analyse au niveau de la structure anatomique entière ou au niveau de sous-structures). Cependant, cette tâche étant fastidieuse et chronophage, l'atlas est généralement réalisé sur une seule image 3D ([Bertrand and Nissanov, 2008](#); [Scheenstra et al., 2009](#)). Pour s'affranchir des biais anatomiques dus à la variabilité inter-individuelle et ainsi créer un atlas plus représentatif d'une population, certaines équipes ont segmenté manuellement non plus une image native, mais une image représentative d'une population

(*template*) créée en recalant linéairement et parfois non linéairement plusieurs images acquises sur différents sujets (Kovacević et al., 2005; Bock et al., 2006; MacKenzie-Graham et al., 2006; Dorr et al., 2007).

Le tableau 1.2 synthétise les objectifs des études présentées précédemment ainsi que ceux de projets tiers s'appuyant sur des atlas numériques 3D de cerveaux de rongeur créés à partir de segmentations manuelles réalisées sur des données expérimentales pour analyser ensuite leurs données.

Études	Objectifs des études
Rubins et al. (2003)	Création d'un atlas de régions cérébrales chez le Rat, basé sur des photographies, en vue d'analyser des images TEP.
Mackenzie-Graham et al. (2004)	Création d'un atlas des régions cérébrales de la Souris, basé sur des images IRM, des coupes histologiques et des photographies
Kovacević et al. (2005)	Création d'un atlas de régions cérébrales chez la Souris, basé sur un <i>template</i> IRM.
Bock et al. (2006)	Détection d'anomalies cérébrales morphométriques chez la Souris cdf/cdf détectées en IRM en utilisant un atlas numérique
Chen et al. (2006)	Etude des différences anatomiques détectées en IRM entre des lignées de souris
MacKenzie-Graham et al. (2006)	Analyse par atlas de l'atrophie corticale détectée par IRM chez des souris modélisant une pathologie liée à l'inflammation
Chan et al. (2007)	Développement de repères stéréotaxiques en 3D
Dorr et al. (2007)	Création d'un atlas du système vasculaire cérébral de la Souris, superposé à un atlas de régions cérébrales
Dorr et al. (2008)	Création d'un atlas de régions cérébrales chez la Souris, basé sur des images IRM
Bertrand and Nissanov (2008)	Création d'un atlas de régions cérébrales chez la Souris, basé sur un volume histologique
Maheswaran et al. (2009a)	Comparaison des approches d'analyse par atlas et par comparaison statistique pour des études morphométriques longitudinales menées sur des IRM de cerveaux de souris sauvages et modélisant la maladie d'Alzheimer
Maheswaran et al. (2009b)	Etude morphométrique longitudinale menée, par une approche d'analyse par atlas, sur des IRM de cerveaux de souris sauvages et modélisant la maladie d'Alzheimer
Scheenstra et al. (2009)	Segmentation d'IRM pondérées en T2 (acquises <i>in vivo</i> ) et en T1 (acquises <i>post mortem</i> )

Tableau 1.2 – Objectifs des études détaillant la création d'atlas numériques 3D de cerveaux de rongeur à partir de segmentations manuelles réalisées sur des données expérimentales et/ou leur utilisation.

*A partir de segmentations issues d'un atlas papier numérisé*

Un atlas numérique 3D peut également être construit à partir des cartographies réalisées manuellement grâce au contraste tissulaire mis en évidence sur des coupes histologiques (Paxinos and Watson, 1986; Swanson, 1998; Paxinos and Franklin, 2001; Paxinos and Watson, 2005). Toga *et al.*, Hjernevik *et al.*, Carson *et al.* mais aussi Purger *et al.* ont numérisé puis empilé ces cartographies pour créer un modèle numérique de cerveaux de rat et de souris (Toga *et al.*, 1989; Palombi *et al.*, 2006; Hjernevik *et al.*, 2007; Pain *et al.*, 2008; Purger *et al.*, 2009; Carson *et al.*, 2010). Les structures tridimensionnelles de ces atlas ont été obtenues en utilisant des logiciels tels que Amira et en interpolant les contours des segmentations 2D entre eux pour créer des rendus surfaciques. Purger *et al.* ont par la suite recalé manuellement l'atlas initial sur plusieurs IRM puis créé un atlas moyen.

Cette technique, intuitive pour s'affranchir de la segmentation manuelle, fournit cependant un atlas numérique peu cohérent en 3D. La reconstruction 3D de ces modèles numériques souffre en effet des limites de reconstruction 3D par propagation (cf. paragraphe 1.5.1.1 (p. 44)) d'autant plus que les coupes utilisées sont espacées entre elles et ne sont pas équidistantes tout au long du cerveau. Purger *et al.* ont par ailleurs remarqué que certaines structures, notamment de la matière blanche (corps calleux et capsule externe) ne pouvaient être reconstruites avec précision du fait d'un manque d'informations sur ces régions dans les atlas papiers.

Le [tableau 1.3](#) synthétise les objectifs des études présentées précédemment ainsi que ceux de projets tiers s'appuyant sur des atlas numériques 3D de cerveaux de rongeur créés à partir de cartographies papier pour analyser leurs données.

<b>Études</b>	<b>Objectifs des études</b>
Toga <i>et al.</i> (1989)	Création d'un atlas de régions cérébrales chez le Rat
Palombi <i>et al.</i> (2006)	Développement d'un outil pour mettre en évidence les interactions des structures cérébrales chez le Rat
Hjernevik <i>et al.</i> (2007)	Développement d'une plateforme informatique pour superposer dans un repère stéréotaxique des images TEP, TDM et IRM
Pain <i>et al.</i> (2008)	Création d'un atlas de régions cérébrales chez le Rat pour analyser des images TEP
Purger <i>et al.</i> (2009)	Création d'un atlas de régions cérébrales chez la Souris
Carson <i>et al.</i> (2010)	Développement d'un outil pour analyser des coupes histologiques grâce à un atlas

*Tableau 1.3 – Objectifs des études détaillant la création d'atlas numériques 3D de cerveaux de rongeur à partir de cartographies papiers et/ou leur utilisation.*

*A partir de segmentations semi-automatiques réalisées sur une ou plusieurs images 3D*

Une troisième possibilité pour construire un atlas numérique 3D est de segmenter semi-automatiquement une ou plusieurs images 3D. Nos recherches bibliographiques ont montré que les images utilisées pour réaliser ces atlas ont toutes été acquises en IRM.

Dans l'étude de Lee et al. (2005a), chaque IRM cérébrale, pondérée en T2, a été manuellement segmentée en 13 régions en utilisant un logiciel développé dans leur laboratoire (Shattuck et al., 2004). Ces images ont été acquises *post mortem* et *intra cranium* sur des souris âgées d'un jour. Pour construire l'atlas, un *template* IRM a d'abord été créé en recalant, par des transformations rigides et affines, les données natives dans un référentiel commun puis en les normalisant en intensité. Une image moyenne a été créée à partir des IRM recalées, servant par la suite de référence pour recalculer non linéairement tous les images. Cette image moyenne a elle aussi été segmentée manuellement ; les tracés initiaux ont ainsi pu être recalés dans ce référentiel. L'atlas final a été créé en moyennant ces segmentations recalées. Une carte de probabilité d'appartenance d'un pixel à une structure a également été calculée selon la méthode décrite dans Watanabe et al. (2001) et Chiavaras et al. (2001).

Pour réaliser leurs atlas, Ma et al. ont d'abord segmenté manuellement, avec le logiciel Amira, 20 régions de cerveau de souris sur une IRM représentative de leur jeu de données. Pour leur première étude (Ma et al., 2005), cette IRM a été pondérée en T2\* et acquise *post mortem*<sup>s</sup>. Pour leur seconde étude (Ma et al., 2008), il s'agissait d'une IRM pondérée en T2 et acquise *in vivo*. Les autres IRM de la base de données ont été recalées de manière rigide puis non linéairement sur l'IRM représentative associée. Trois atlas ont ensuite été créés :

- Un premier atlas, dit *de déformation minimale*, a été créé par un processus itératif qui a consisté à : 1) déformer la segmentation manuelle sur chacune des IRM recalées par des transformations affines et élastiques ; 2) créer une image moyenne à partir des segmentations. L'algorithme a itéré jusqu'à ce qu'un critère de convergence soit atteint.
- La *carte de déformation* induite par le recalage a été calculée.
- Enfin, un *atlas probabiliste* a été construit à partir des déformations affines de la segmentation manuelle initiale : la valeur des pixels de ce nouvel atlas représente la probabilité d'appartenance à une structure.

Badea et al. ont de leur côté déployé une méthode un peu différente pour construire leur atlas de cerveau de souris (Badea et al., 2007, 2009). Cette équipe a utilisé la méthode des champs de Markov (cf. paragraphe 1.4.2.2 (p. 41)) pour classifier, à partir de segmentations manuelles, les pixels d'IRM pondérées en T1 et en T2 selon leur intensité et

---

s. Une IRM pondérée en T2\* peut être obtenue en modifiant le paramétrage de la séquence IRM permettant d'obtenir une image pondérée en T2. Les IRM pondérées en T2\* sont sensibles aux inhomogénéités locales (dues notamment au contact de l'air). Les zones contenant beaucoup de fer, telles que les vaisseaux sanguins, sont bien mises en évidence avec cette séquence.

des *a priori* spatiaux (localisation d'une structure dans le cerveau et organisation générale des structures entre elles). Cette segmentation d'IRM est décrite dans [Ali et al. \(2005\)](#) et [Sharief et al. \(2008\)](#). Trente-trois structures ont ainsi pu être segmentées sur chacune des images de leur base de données, préalablement normalisées spatialement et en intensité. Des *templates* d'IRM pondérées en T1 et en T2 ont été créés à partir des images natives recalées non linéairement dans le référentiel commun. Les transformations non linéaires ont été appliquées aux volumes de labels précédemment créés. Un *atlas moyen* a finalement été créé en moyennant ces volumes de labels recalés non linéairement puis en ré-échantillonnant le résultat au plus proche voisin pour conserver les valeurs d'intensité d'origine et éviter de créer de nouveaux labels par interpolation. Un atlas probabiliste a été également construit en utilisant la méthode décrite par [Ma et al. \(2005\)](#).

Le [tableau 1.4](#) synthétise les objectifs des études présentées précédemment ainsi que ceux de projets tiers s'appuyant sur des atlas numériques 3D de cerveaux de rongeur créés semi-automatiquement pour analyser leurs données.

Etudes	Objectifs des études
<a href="#">Ma et al. (2005)</a>	Création d'atlas moyen et probabiliste à partir d'IRM cérébrales de Souris, acquises <i>in vitro</i>
<a href="#">Lee et al. (2005a)</a>	Création d'un atlas de régions cérébrales pour le Souriceau à partir d'IRM
<a href="#">Badea et al. (2007)</a>	Analyse morphométrique de cerveaux de Souris sauvages, basée sur des IRM
<a href="#">Ma et al. (2008)</a>	Création d'atlas moyen et probabiliste à partir d'IRM cérébrales de Souris, acquises <i>in vivo</i>
<a href="#">Badea et al. (2009)</a>	Analyse morphométrique de cerveaux de Souris, basée sur des IRM, sur 11 lignées différentes

Tableau 1.4 – Objectifs des études détaillant la création semi-automatique d'atlas numériques 3D de cerveaux de rongeur et/ou leur utilisation.

### 1.5.3.2 Utilisation d'un atlas numérique

La liste non exhaustive des études citées dans les [tableaux 1.2](#), [1.3](#) et [1.4](#) traitent préférentiellement de la description même de la construction d'atlas plutôt que de leur utilisation. Dans les articles présentant une analyse de données *via* la segmentation fournie par un atlas, les images cérébrales de rongeurs ont été acquises exclusivement par IRM ([Bock et al., 2006](#); [Chen et al., 2006](#); [MacKenzie-Graham et al., 2006](#); [Maheswaran et al., 2009a,b](#); [Badea et al., 2007, 2009](#)). A notre connaissance, **l'approche atlas n'a donc pas encore été utilisée pour analyser des données acquises *post mortem* et *ex situ*, reconstruites en 3D** (autrement dit des volumes histologiques et autoradiographiques).

### 1.5.3.3 Partage de données au sein de la communauté scientifique

Les équipes citées ci-dessus ont principalement développé des atlas de cerveaux de rongeur pour leurs applications propres ainsi que les outils de traitements d'images associés. Les modèles numériques n'ont pas été diffusés hors des laboratoires respectifs.

Cependant depuis quelques années certaines équipes diffusent *via* le site internet de leur laboratoire ou grâce à des communautés virtuelles leurs outils voire leurs données pour créer des banques d'images et de logiciels susceptibles d'être utilisées par d'autres laboratoires de recherche. Certains outils et images, comme le logiciel *BrainNavigator* (<http://www.brainnav.com/home/>), sont uniquement accessibles en ligne. De plus, *BrainNavigator* est avant tout un outil pédagogique qui permet de naviguer en 3D dans le cerveau de souris afin de comprendre l'organisation des structures cérébrales.

De plus en plus de laboratoires ne se contentent plus de publier leurs données ; ils offrent également la possibilité aux autres chercheurs de les télécharger. Dans sa revue, Boline *et al.* présente des grands projets communautaires, destinés principalement à l'étude des gènes dans les cerveaux de souris (Boline *et al.*, 2008).

Nous pouvons par exemple citer :

- la *Mouse Brain Library* (MBL, <http://www.mbl.org>), bibliothèque virtuelle où sont accessibles des coupes histologiques de résolutions variables (entre  $\sim 0,2$  et  $25 \mu\text{m}/\text{pixel}$ ) obtenues pour différentes lignées de souris (Rosen *et al.*, 2003) ;
- le *Mouse Atlas Project* (MAP, <http://www.loni.ucla.edu/MAP/>), projet chargé de développer des outils pour visualiser, en une unique interface, à la fois les structures cérébrales et l'expression des gènes (MacKenzie-Graham *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005a) ;
- l'*Allen Brain Atlas* (ABA, <http://www.brain-map.org>), banque d'images interactive illustrant notamment l'expression de gènes dans le cerveau de souris, observable grâce au logiciel *Brain Explorer* (Lau *et al.*, 2008a) ;
- la base de données (CCDB, <http://ccdb.ucsd.edu/>) collectant des images obtenues grâce à des techniques de microscopie (Martone *et al.*, 2004) ;
- le **Biomedical Informatics Research Network** (BIRN, <http://www.birncommunity.org/>), base de données réunissant nombre des projets cités ci-dessus. Il s'agit de la première cyber-structure américaine créée pour la recherche biomédicale en 2001 par le National Center for Research Resources, unité de l'institut américain, le National Institute of Health (NIH). La majorité des travaux recensés par ce réseau présente la création et l'utilisation d'atlas numériques 3D pour analyser des données de cerveaux de souris.

## 1.6 Problématique du projet de thèse : analyse par atlas de données *post mortem* reconstruites en 3D

La première section de ce chapitre a montré que la recherche pré-clinique était essentielle pour comprendre le mécanisme de certaines pathologies humaines et étudier l'effet de nouvelles thérapeutiques sur ces dernières. Les modèles murins sont encore aujourd'hui de très bons modèles pour étudier ces maladies et particulièrement celles impliquant les neurodégénérescences comme la maladie d'Alzheimer. Pour observer ces phénomènes, les scientifiques utilisent de plus en plus diverses méthodes d'imagerie qui permettent de voir l'intérieur de l'organisme, d'un point de vue anatomique mais aussi fonctionnel (cf. [section 1.2 \(p. 9\)](#)). Pour coupler par la suite un ensemble d'images acquises sur un même sujet ou comparer des données entre plusieurs individus, de nombreux algorithmes ont été développés pour mettre en correspondance ces images enregistrées au cours du temps, par différentes modalités ou même celles acquises sur plusieurs sujets (cf. [section 1.3 \(p. 23\)](#)).

Dans le cadre d'études pré-cliniques, et notamment celles concernant le petit animal tel que la souris, les techniques fournissant des images de plus grande spécificité de marquage et avec la meilleure résolution spatiale restent celles qualifiées de *post mortem* et *ex situ*. Il s'agit donc des techniques d'autoradiographie, pour avoir une information fonctionnelle sur l'organisme avant euthanasie, et des marquages histologiques, pour obtenir des informations anatomiques.

Le principal inconvénient de ces techniques est de fournir des images en deux dimensions. La géométrie native (tridimensionnelle) de l'objet étudié est donc perdue. La méthode classique pour analyser ce type de données est la segmentation manuelle guidée par des atlas papier. Elle requiert l'intervention d'experts en biologie pour cibler, identifier et extraire les informations pertinentes dans chaque étude. Ce travail étant long et fastidieux, seul un nombre limité de coupes prélevées ou de régions anatomiques est généralement traité, laissant inexploitées une grande quantité d'informations.

Pour pallier cet inconvénient, différentes méthodes ont été développées pour reconstruire en trois dimensions des séries de données 2D (cf. [paragraphe 1.5.1 \(p. 44\)](#)). Les chercheurs ont ainsi pu résoudre le problème de la perte de cohérence spatiale. Néanmoins, l'analyse de tels volumes reste encore complexe à réaliser en recherche pré-clinique. Quelques équipes sont parvenues à extraire de nouvelles informations sur ces images 3D en comparant statistiquement, pixel à pixel, des groupes de données. Cependant, cette approche d'analyse présente des limitations quant à l'interprétation des résultats (notamment l'identification des structures anatomiques impliquées dans le phénomène étudié) et ne peut être appliquée que sur des groupes de sujets (cf. [paragraphe 1.5.2 \(p. 47\)](#)).

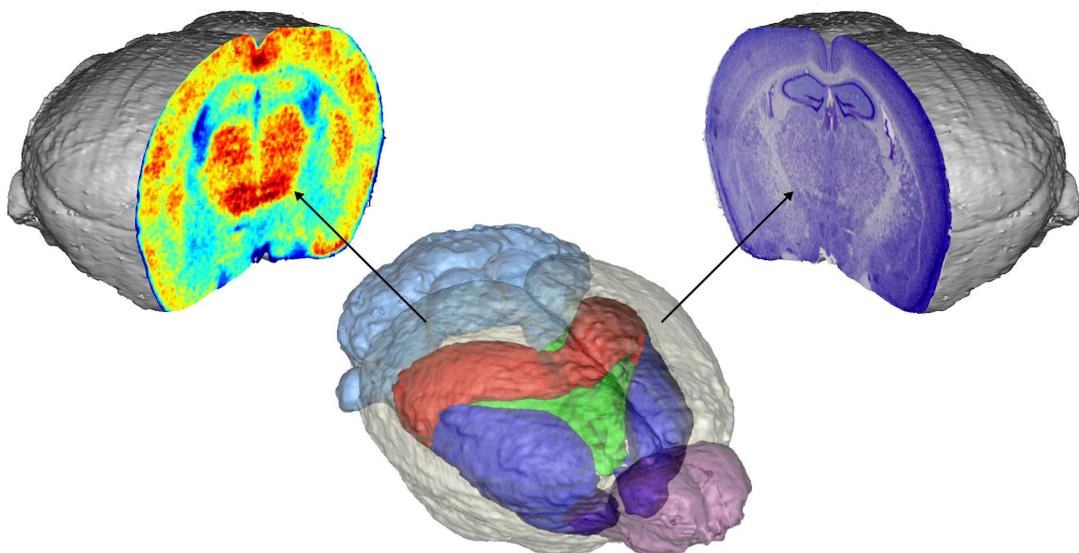
En parallèle de ces développements algorithmiques, d'autres équipes se sont intéressées à la construction d'atlas numériques destinés aussi bien à décrire la géométrie des structures et leur position relative dans l'espace qu'à potentiellement analyser des images (cf. paragraphe 1.5.3 (p. 52)).

**L'objectif de mon travail de thèse a été d'évaluer s'il était possible et pertinent d'analyser des images cérébrales 3D acquises *post mortem* chez le Rongeur, plus particulièrement chez la Souris, grâce à un atlas numérique 3D.**

A notre connaissance, aucune équipe n'a utilisé ce genre de modèle numérique pour analyser, sur le petit animal, des données cérébrales *post mortem ex situ* reconstruites en 3D. Cette approche peut se révéler pertinente car, en recalant un tel atlas sur des volumes histologiques ou autoradiographiques, elle permettrait de segmenter rapidement l'ensemble des volumes en plusieurs structures anatomiques. Des informations morphométriques mais aussi fonctionnelles, à l'échelle des régions définies par l'atlas, pourraient alors être obtenues en un temps moindre que celui requis par la méthode classique (manuelle).

La première tâche a été de se procurer un atlas numérique de cerveau de souris. L'étude bibliographique présentée nous a permis de découvrir l'existence de modèles numériques de cerveau de souris accessibles en ligne. Nous avons pu dans un premier temps télécharger ces images et voir s'il était possible d'utiliser un de ces atlas pour analyser des volumes *post mortem*. Nous avons ensuite développé et validé une stratégie de mise en correspondance d'images permettant *in fine* de segmenter des volumes *post mortem* avec les régions délimitées par l'atlas. Dans un second temps, l'utilisation d'un tel outil combiné à l'approche d'analyse par comparaison statistique a été évaluée en vue de cumuler les avantages fournis par chacune de ces méthodes et ainsi faciliter, voire améliorer la qualité des résultats obtenus.

*La description des différentes techniques d'analyse d'images, notamment acquises post mortem, a révélé d'importantes limitations à l'exploitation de ce type de données. Considérant nécessaire de s'affranchir de ce problème pour améliorer nos connaissances sur certaines pathologies, notamment neurodégénératives, nous avons voulu répondre à cette problématique de recherche en explorant l'approche d'analyse de données post mortem par atlas numérique 3D (voir figure 1.21 pour illustration). Nos recherches bibliographiques nous ont conduit sur un site de partage de données où sont notamment téléchargeables deux atlas de cerveaux de souris créés par des équipes différentes. Nous présentons leurs caractéristiques dans le chapitre suivant. Pour développer notre stratégie d'analyse d'images pré-cliniques post mortem, par atlas numérique 3D, nous avons considéré un jeu de données du laboratoire, obtenu dans le cadre d'une étude préliminaire sur la maladie d'Alzheimer. Ce dernier est également décrit dans le chapitre qui suit.*

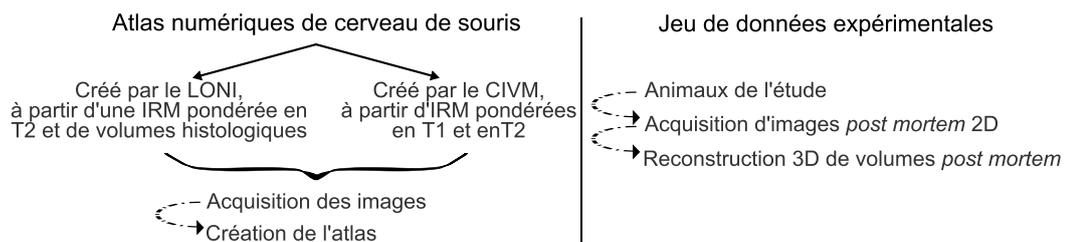


*Figure 1.21 – Approche d'analyse par un atlas numérique 3D (au milieu) de données post mortem autoradiographiques (à gauche) et histologiques (à droite) reconstruites en 3D.*

# Chapitre 2

## Atlas numériques utilisés et données expérimentales étudiées

*Dans ce chapitre sont présentés deux atlas numériques tridimensionnels de cerveau de souris choisis pour développer notre approche d'analyse d'images post mortem par atlas. La méthodologie proposée a été mise en œuvre sur un jeu de données du laboratoire acquis dans le cadre d'une étude préliminaire sur la maladie d'Alzheimer. L'acquisition et la reconstruction de ces images sont décrites dans la seconde partie de ce chapitre. La figure 2.1 présente une vue synthétique de l'organisation de ce chapitre ainsi que des principaux points abordés.*



*Figure 2.1 - Organisation du chapitre 2 de ce manuscrit et principaux points abordés.*

## 2.1 Atlas numériques 3D de cerveau de souris



Le Biomedical Informatics Research Network (**BIRN**) est une communauté scientifique virtuelle qui permet de partager des ressources (données, outils de visualisation/traitement d'images) susceptibles de faire avancer le diagnostic et le traitement de pathologies ([Boline et al., 2008](#)). Au début de mon projet de thèse, nos recherches bibliographiques ont révélé que ce réseau mettait à disposition de la communauté scientifique deux modèles numériques de cerveau de souris développés par deux laboratoires américains :

- le Laboratory Of Neuro Imaging (**LONI**) de l'Université de Californie à Los Angeles ;
- le Center for *In Vivo* Microscopy (**CIVM**) rattaché à l'Université de Duke en Caroline du Nord.

Ces deux atlas ont été créés par deux méthodes différentes. Ne pouvant de prime abord identifier l'atlas le mieux adapté à l'analyse de nos données, nous avons décidé de télécharger et de tester les deux afin de les évaluer pour sélectionner le plus adéquat. Les paragraphes 2.1.1 et 2.1.2 décrivent les caractéristiques des images mises à disposition.

### 2.1.1 Atlas créé par le LONI

L'équipe d'Allan MacKenzie-Graham du Laboratory Of Neuro Imaging (LONI) de l'Université de Californie à Los Angeles a publié, en 2004, puis distribué *via* le réseau du BIRN, un atlas de cerveau de souris généré à partir d'une IRM pondérée en T2 et des coupes histologiques ([Mackenzie-Graham et al., 2004](#)).

#### 2.1.1.1 Protocole expérimental

Cet atlas a été réalisé sur une souris mâle C57BL/6J âgée de 100 jours. Cette lignée dite *sauvage* (par opposition à *transgénique*) est largement utilisée en laboratoire du fait de la facilité de reproduction et de leur bonne espérance de vie (2 à 3 ans). Les souris ayant ce génotype présentent une bonne tolérance à la plupart des mutations génétiques subies tout en ayant une dégénérescence tumorale limitée.

Le modèle numérique de cerveau a été créé à partir d'une IRM pondérée en T2 acquise *ex vivo* (11,7 teslas, TR = 1500ms et TE = 10 ms). Cette IRM, définie dans une matrice de  $512 \times 256 \times 256$  pixels avec une résolution isotropique de  $56 \mu\text{m}$  et mise à la disposition de la communauté scientifique est illustrée en [figure 2.2\(a\)](#). Sur cette figure, la matière blanche apparaît en hypersignal par rapport à la matière grise et les fluides (liquide céphalorachidien) en hyposignal. Des traitements ont dû être appliqués *a posteriori*.

Le cerveau de l'animal a ensuite été sectionné selon le plan coronal, en coupes de 50  $\mu\text{m}$ . Les corps de Nissl, la myéline et l'acétylcholine estérase ont été marqués sur différentes coupes prélevées. Elles ont ensuite été numérisées. Les coupes ont été réalignées entre elles de façon rigide en utilisant la méthode du Block-Matching (Ourselin et al., 2001) *via* le logiciel Baladin. Les volumes d'images *post mortem* ont été reconstruits en utilisant le logiciel Reunite (Automated Image Registration 4.0, Woods et al. (1998a,b)). Ces derniers, ainsi que le volume IRM acquis auparavant, ont enfin été recalés avec le logiciel Baladin, dans un référentiel défini par le plan inter-hémisphérique et la ligne inter-auriculaire décrits dans Paxinos and Franklin (2001).

#### 2.1.1.2 Création de l'atlas du LONI

Trente-sept structures ont été manuellement segmentées sur les coupes *post mortem* numérisées avec le logiciel Illustrator 9.0 (Adobe) en s'appuyant sur les segmentations cérébrales définies dans Paxinos and Franklin (2001). Ces tracés ont été exportés dans le logiciel Light-Wave (NewTek) pour reconstruire en 3D les surfaces des structures segmentées. Celles-ci ont enfin été réajustées manuellement, sur les volumes IRM et *post mortem* grâce au logiciel BrainSuite (Shattuck and Leahy, 2002). La liste des structures labellisées figure en annexe B (p. 178).

L'atlas de cerveau de souris proposé par cette équipe est illustré en figure 2.2(b). Nous observons des décrochages importants au niveau des interfaces des segmentations (indiqués par les rectangles noirs dans la figure).

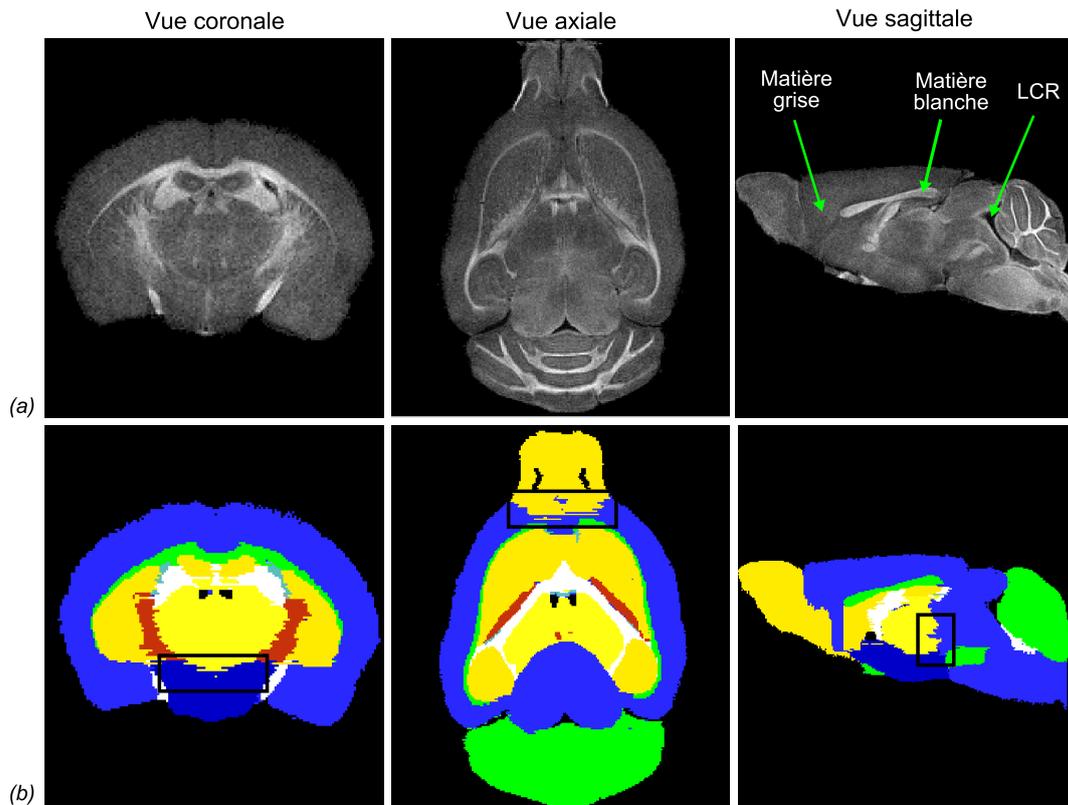


Figure 2.2 – Modèle numérique de cerveau de souris créé par une équipe du LONI : (a) IRM pondérée en T2 acquise ex vivo et utilisée pour créer l'atlas. Nous notons que des traitements ont dû être appliqués a posteriori sur l'image pour obtenir la matière blanche en hypersignal par rapport à la matière grise et les fluides (liquide céphalo-rachidien) en hyposignal. (b) Atlas 3D créé à partir de l'IRM (a). Les rectangles noirs mettent en évidence des décrochages importants au niveau des interfaces des segmentations.

## 2.1.2 Atlas créé par le CIVM

De son côté, l'équipe de G. Allan Johnson du Center for *In Vivo* Microscopy (CIVM) de l'Université de Duke en Caroline du Nord, a développé un atlas de cerveau de souris à partir d'IRM pondérées en T1 et en T2 (Sharief and Johnson, 2006; Johnson et al., 2007; Badea et al., 2007).

### 2.1.2.1 Protocole expérimental

Les IRM (9,4 teslas) ont été acquises sur six souris C57BL/6J âgées de 9 semaines. Les animaux ont été anesthésiés avec du Nembutal, puis perfusés à deux reprises, avec des solutions composées d'un agent de contraste IRM à base de Gadolinium. Ces perfusions ont permis de fixer le tissu cérébral tout en réduisant le temps de relaxation T1 (Johnson et al., 2002, 2007). La résolution temporelle des IRM a donc été améliorée. Après une nuit d'immersion dans du formaldéhyde, les cerveaux ont été imagés *in situ*, *i.e.* dans la boîte crânienne, pour préserver leur géométrie native et éviter les déformations dues à l'extraction (Johnson et al., 2007; Badea et al., 2007; Dorr et al., 2008). Les images pondérées en T1 (avec TE = 5,1 ms et TR = 50 ms) et T2 (avec TE = 7 ms et TR = 400 ms) ont été produites respectivement dans des matrices de  $512 \times 512 \times 1024$  et  $256 \times 256 \times 512$  pixels avec des résolutions isotropes de 21,5 et 43  $\mu\text{m}$ . Pour améliorer le contraste des images pondérées en T2 acquises sur des sujets perfusés, la séquence 3D Carr-Purcell-Meiboom-Gill a été paramétrée dans le système d'acquisition des IRM. La méthode Multiple Echo Frequency-domain Image Contrast a par la suite été appliquée aux IRM pondérées en T2 afin d'améliorer le contraste de ces images (Sharief and Johnson, 2006). Contrairement à la méthode classique qui optimise un contraste tissulaire pour des structures particulières et à un TE donné, cette méthode consiste à augmenter le contraste entre tous les tissus caractérisés par des T2 différents.

Des IRM pondérées en T1 et en T2, représentatives du jeu de données et distribuées à la communauté scientifique *via* le réseau du BIRN, sont illustrées en figures 2.3(a) et (b). Notons que l'agent de contraste injecté avant l'acquisition des IRM a modifié le contraste attendu dans une IRM pondérée en T1. Dans la figure 2.3(a), les fluides (LCR) apparaissent en hypersignal et la matière blanche est en hyposignal par rapport à la matière grise. Nous observons également que des artéfacts tel qu'une certaine hétérogénéité de la matière grise sont présents dans l'IRM pondérée en T2 (dans les bulbes olfactifs par exemple, voir ellipse blanche dans la figure 2.3(b)).

### 2.1.2.2 Création de l'atlas du CIVM

#### *Normalisation des IRM*

Des opérations de morphologie mathématique ont été appliquées sur les IRM afin d'extraire les cerveaux des boîtes crâniennes (Höhne and Hanson, 1992; Badea et al., 2003) : les images ont été lissées, seuillées puis érodées. Les masques ont été modifiés en ajoutant tout pixel connexe au centre des volumes IRM dont l'intensité appartenait à un intervalle de valeurs fixées. Ces masques ont ensuite été dilatés autant de fois que les IRM avaient été précédemment érodées pour restituer le volume initial. Enfin, les IRM ont été normalisées en intensité et recalées dans un référentiel commun en utilisant une transformation affine du logiciel Image Registration Toolkit.

#### *Utilisation des champs de Markov pour segmenter chaque IRM*

Cette équipe a utilisé la méthode des champs de Markov (cf. paragraphe 1.4.2.2 (p. 41)) pour classifier, à partir de segmentations manuelles, les pixels d'IRM pondérées en T1 et en T2 selon leur intensité et des *a priori* spatiaux (localisation d'une structure dans le cerveau et organisation générale des structures entre elles).

Trente-trois structures anatomiques, comprenant des régions de tailles variables de la matière grise et de la matière blanche ont pu être segmentées en se basant sur des segmentations manuelles. Ces dernières ont été délimitées sur chaque IRM pondérée en T2 grâce à l'outil ImageJ et sous incidence axiale (Sharief et al., 2008). La liste des structures labellisées se trouve en annexe C (p. 181). Pour réaliser ces tracés, l'équipe s'est appuyée sur les contrastes des images pondérées en T1 et la nomenclature anatomique définie dans Paxinos and Franklin (2001). Les segmentations ont été corrigées sous les deux autres incidences avec le logiciel de visualisation SHIVA (MacKenzie-Graham et al., 2003).

La figure 2.3(c) représente la segmentation réalisée sur un animal.

#### *Création de templates d'IRM et de l'atlas final*

Une image moyenne a été créée à partir des IRM pondérées en T1, une autre image représentative a été créée à partir des IRM pondérées en T2. Les IRM natives ont été recalées non linéairement sur ces images représentatives. Des *templates* d'IRM pondérées en T1 (*template IRM-T1*) et en T2 (*template IRM-T2*) ont finalement été créés en moyennant de nouveau les IRM recalées.

Les transformations non linéaires estimées sur les IRM ont été appliquées à chaque segmentation en interpolant au plus proche voisin pour conserver les labels. L'atlas final a finalement été obtenu en moyennant les segmentations recalées.

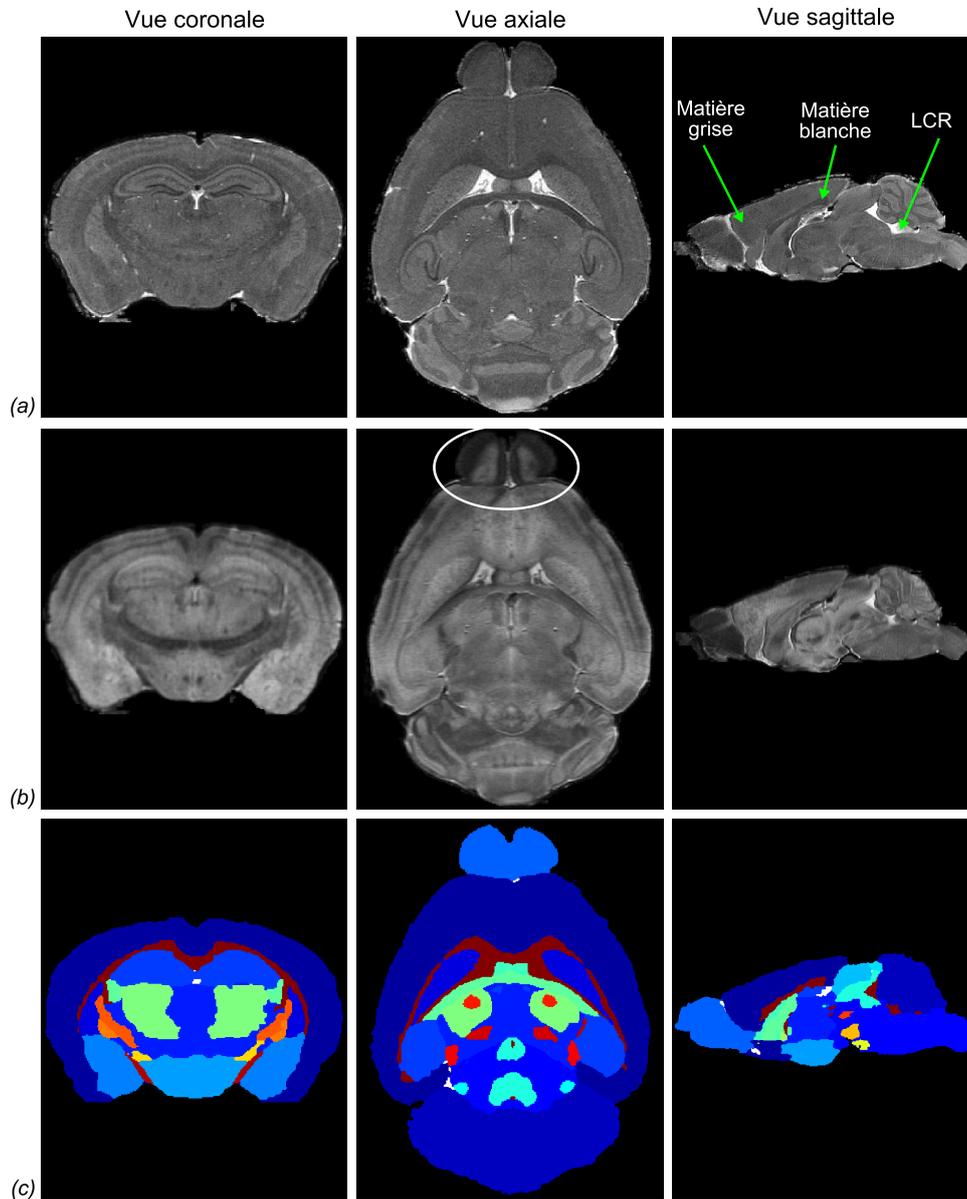


Figure 2.3 – Modèle numérique de cerveau de souris créé par une équipe du CIVM : (a) IRM pondérée en T1 (après injection d'un produit de contraste) représentative du jeu de données. Le liquide céphalo-rachidien (LCR) est en hypersignal et la matière blanche est en hyposignal par rapport à la matière grise. (b) IRM pondérée en T2 acquise sur le même animal. L'ellipse blanche met en évidence des hétérogénéités de la matière grise. (c) Atlas 3D créé à partir des deux IRM. Ces images sont présentées sous les incidences coronales, axiales et sagittales.

Le [tableau 2.1](#) récapitule les principales caractéristiques des deux modèles numériques de cerveau de souris.

	<b>Atlas créé par le LONI</b>	<b>Atlas créé par le CIVM</b>
<b>Sujets</b>	Souris mâle C57BL/6J (n = 1)	Souris C57BL/6J (n = 6)
<b>Age</b>	≈100 jours	≈63 jours
<b>Images acquises</b>	IRM pondérée en T2 <i>ex vivo</i> (11,7 teslas), résolution isotropique de $56\mu\text{m}^3$ , post traitements apportés à l'image	IRM pondérée en T1 <i>post mortem, intra cranium</i> et après injection d'agent de contraste (9,4 teslas), résolution isotropique de $21,5\mu\text{m}^3$
	Coupes histologiques	IRM pondérée en T2 <i>post mortem, intra cranium</i> et après injection d'agent de contraste et traitement selon la méthode MEFIC (9,4 teslas), résolution isotropique de $43\mu\text{m}^3$
<b>Atlas</b>	Segmentation manuelle des coupes histologiques, réajustée sur l'IRM (37 structures)	Segmentation semi-automatique à partir des IRM pondérées en T1 et en T2 (33 structures)
<b>Données disponibles</b>	IRM pondérée en T2 Atlas	pour n = 1
		IRM pondérées en T1 et en T2 Atlas

Tableau 2.1 – Caractéristiques des atlas créés par le LONI (à gauche) et par le CIVM (à droite).

## 2.2 Données expérimentales de l'étude préliminaire sur la maladie d'Alzheimer

### 2.2.1 Animaux étudiés

La méthode développée dans mon projet de thèse a été testée sur **quatre souris transgéniques APP<sub>SL</sub>/PS1<sub>M146L</sub>** âgées de  $64 \pm 1$  semaines et de **trois souris transgéniques PS1<sub>M146L</sub>** âgées de  $65 \pm 2$  semaines. La lignée transgénique APP<sub>SL</sub>/PS1<sub>M146L</sub> a été obtenue en intégrant au génome de l'animal :

- le gène de l'APP humain portant les mutations dites *Swedish* (K670M/N671L) et *London* (V717I) (Hsiao et al., 1996; Hardy, 1997);
- le gène PS1 humain portant la mutation M146L (Imafuku et al., 1999).

Sur-exprimé, le gène PS1 muté accélère le dépôt amyloïde généré par l'APP muté (Blanchard et al., 2003). Les souris porteuses de cette première modification génétique (souris PS1<sub>M146L</sub>) ne présentent pas de phénotype pathologique et peuvent être utilisées comme contrôles pour les souris APP<sub>SL</sub>/PS1<sub>M146L</sub> (Delatour et al., 2006). Ces deux lignées de souris ont le même fond génétique que les souris C57BL/6.

Toutes les procédures ont été effectuées en conformité avec les recommandations de l'Union Européenne (directive 86/609/CEE) et le Comité national français (décret 87/848) pour l'utilisation des animaux de laboratoire.

### 2.2.2 Acquisition de données *post mortem*

L'étude a été composée en deux sous-projets :

1. L'objectif du premier projet était d'évaluer et de comparer les différences morphométriques et métaboliques entre le groupe pathologique (souris APP/PS1) et le groupe contrôle (souris PS1).
2. Le second projet avait pour objectif de quantifier et comparer la charge amyloïde entre les deux groupes de souris.

Pour mener en parallèle ces deux études, les hémisphères des cerveaux des souris ont été séparés ; les hémisphères droits ont été traités pour le premier projet, les gauches ont été réservés au second projet. Les expériences et résultats de l'étude de la quantification de la charge amyloïde ne sont pas présentés dans ce manuscrit (Delatour et al., 2006).

Deux techniques d'imagerie *post mortem* et *ex situ* ont permis les études des différences fonctionnelles et anatomiques entre les deux groupes de souris : l'injection d'un traceur radioactif et un marquage histologique.

### 2.2.2.1 Étude de la prise de glucose

Pour évaluer la prise cérébrale de glucose, du 2-desoxyglucose marqué au carbone 14 ( $[^{14}\text{C}]\text{2DG}$ )<sup>a</sup> a été injecté aux souris, vigiles au repos, 45 minutes avant leur euthanasie (temps nécessaire à l'assimilation de ce traceur dans l'organisme). Les cerveaux ont été extraits de la boîte crânienne et les deux hémisphères ont été séparés selon le plan inter-hémisphérique (cf. [figure 1.17 \(p. 40\)](#)). Les échantillons ont été congelés dans de l'isopentane à  $-40^\circ\text{C}$ . Les hémisphères droits ont été sectionnés en coupes coronales de  $20\ \mu\text{m}$  à l'aide d'un cryostat<sup>b</sup> en excluant les parties externes du bulbe olfactif et du cervelet. Une coupe sur quatre a été prélevée et mise sur une lame de verre Superfrost. Pour chaque hémisphère, environ 120 coupes ont été conservées et séchées. Les lames ont été co-exposées pendant une semaine sur un film autoradiographique<sup>c</sup>, avec des standards radioactifs<sup>d</sup> de  $^{14}\text{C}$ .

Lorsque les films autoradiographiques ont été jugés exploitables, **les mêmes coupes ont été utilisées pour obtenir des informations anatomiques.**

### 2.2.2.2 Images anatomiques

Les coupes ont été marquées au **violet de crésyl** pour révéler les corps cellulaires des neurones (se référer au protocole décrit en [paragraphe 1.2.1.3 \(p. 13\)](#)).

Pour faciliter et améliorer la reconstruction de ces données autoradiographiques et histologiques (cf. [paragraphe 1.5.1 \(p. 44\)](#)), des **photographies** numériques<sup>e</sup> des plans de coupe ont été acquises avant le passage du couteau du cryostat. Chaque coupe prélevée a donc été photographiée au préalable, avec une résolution de  $27\times 27\ \mu\text{m}^2$  dans le plan.

---

a.  $16,5\ \mu\text{Ci}/100\text{g}$  de masse corporelle; Perkin Elmer, Boston, MA, USA

b. CM3050S Leica, Rueil-Malmaison, France

c. Kodak Biomax MR

d.  $^{14}\text{C}$ , American Radiochemical Company, St. Louis, MO

e. Canon Powershot G5 Pro 5 Mo pixels

La figure 2.4 illustre le protocole d'acquisition des données expérimentales.

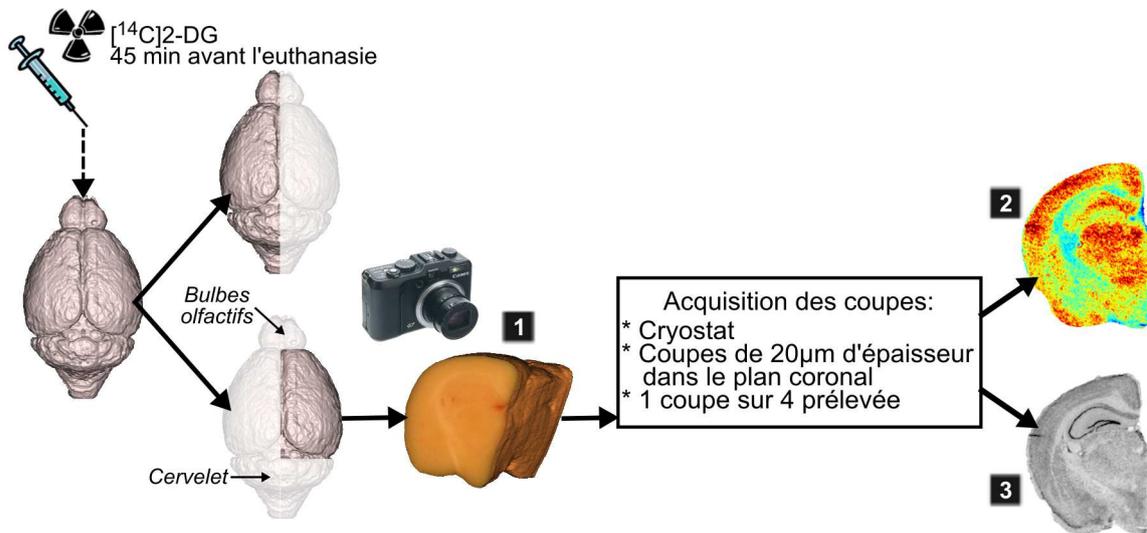


Figure 2.4 – Acquisition des données post mortem du projet : Du  $[^{14}\text{C}]2\text{DG}$  a été injecté in vivo 45 min avant l'euthanasie et l'extraction des cerveaux. L'hémisphère droit sans bulbe olfactif ni cervelet a été traité. Une photographie numérique du plan de coupe a été acquise avant la coupe au cryostat (1). La coupe prélevée a été révélée sur le film autoradiographique (2) puis marquée au violet de crésyl (3).

### 2.2.3 Reconstruction tridimensionnelle des données de l'étude

Pour retrouver la forme originelle des cerveaux étudiés et restituer leur cohérence spatiale, les données des trois modalités ont été reconstruites en 3D. La photographie a été utilisée comme référence.

#### 2.2.3.1 Empilement des photographies et création d'un volume photographique de référence

Les photographies, acquises en couleurs, ont d'abord été empilées. Elles ont ensuite été décomposées en trois images de niveaux de gris correspondant aux composantes rouges, vertes et bleues. La composante rouge, présentant le meilleur contraste entre le tissu cérébral et le milieu d'enrobage, a été utilisée pour segmenter le cerveau et ainsi créer un masque (analyse par histogramme). La composante verte, présentant le meilleur contraste tissulaire, a été masquée par l'image binaire obtenue précédemment. Les images issues des composantes vertes ainsi masquées ont constitué les données de travail (voir figure 2.5).

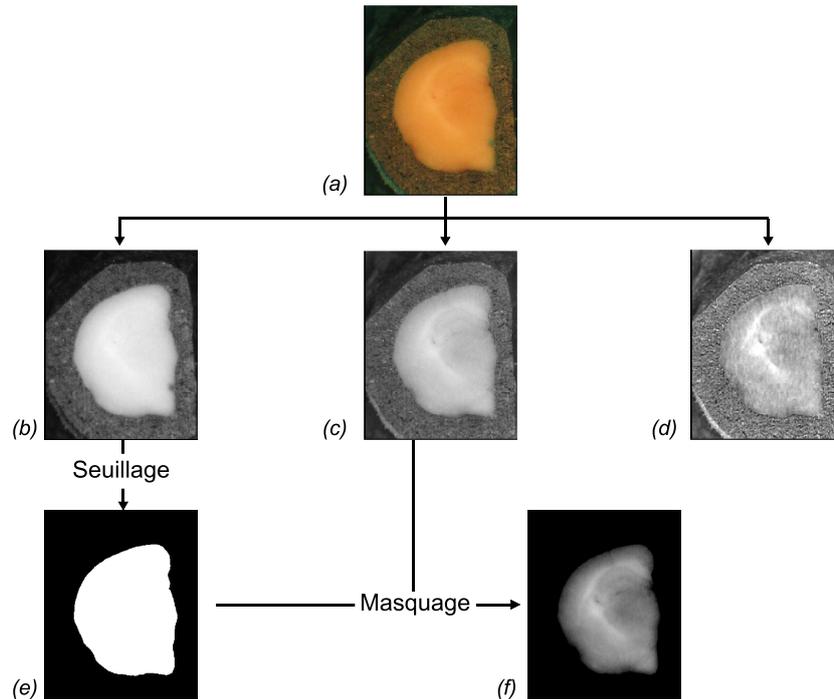


Figure 2.5 – *Traitements des photographies acquises. Les photographies ont été acquises en couleurs (a) puis décomposées en trois images de niveaux de gris correspondant chacune aux composantes rouges (b), vertes (c) et bleues (d). Les composantes rouges ont été seuillées pour créer des masques des cerveaux (e). Les composantes vertes ont été masquées par ces images binarisées et ont constitué les données de travail (f).*

La figure 2.6-1 illustre l’empilement des images issues des composantes vertes et masquées. L’acquisition de ces images ayant eu lieu avant la coupe des cerveaux et réalisée exactement dans la même position par rapport au plan de coupe, la série de photographies présente le même champ de vue. L’empilement génère un volume photographique intrinsèquement cohérent spatialement, dont la dimension est de l’ordre de  $350 \times 308 \times 120$  pixels et la taille de ceux-ci est  $0,027 \times 0,027 \times 0,080$  mm<sup>3</sup> (Dubois et al., 2010b) (cf. figure 2.6-1’).

Les films autoradiographiques (accompagnées des standards radioactifs de <sup>14</sup>C) et les coupes histologiques ont été numérisées sous forme d’images de niveaux de gris, codées sur 8 bits, en utilisant un scanner à plat<sup>f</sup> et avec une résolution de 1200 dpi dans le plan (correspondant à  $\sim 21 \times 21$  μm<sup>2</sup>).

f. ImageScanner ; GE Healthcare Europe, Orsay, France)

### 2.2.3.2 Reconstruction des volumes histologiques et autoradiographiques

Les coupes histologiques et autoradiographiques numérisées ont été empilées dans le plan perpendiculaire du plan d'acquisition et centrées selon le centre de gravité (protocole décrit dans (Dubois et al., 2007, 2008b)). Pour ce faire, les fonctions de traitements d'images biologiques de BrainRAT<sup>g</sup> ont été utilisées (Dubois et al., 2008a). Chaque coupe histologique a ensuite été réalignée, par transformation rigide, avec la photographie lui correspondant (cf. figure 2.6-2). Cette même opération mathématique a permis de réaligner la coupe analogue du volume autoradiographique sur la coupe histologique précédemment traitée (cf. figure 2.6-3). La méthode du Block-Matching, décrite dans Ourselin et al. (2001) et réimplémentée dans BrainVISA (Dauguet, 2005), a été utilisée pour recalibrer ces images 2D multimodales. Ces volumes sont illustrés en figures 2.6-2' et -3'.

L'ensemble de ces étapes, valorisé dans l'article de Dubois et al. (2010b), fournit pour chaque souris et dans un même référentiel spatial, trois volumes d'images acquises *post mortem* :

- un volume photographique décrit dans une matrice de  $350 \times 308 \times 120$  pixels et dont la taille de ceux-ci est  $0,027 \times 0,027 \times 0,080$  mm<sup>3</sup> ;
- un volume histologique décrit dans une matrice de  $479 \times 420 \times 120$  pixels environ et dont la taille de ceux-ci est  $0,021 \times 0,021 \times 0,080$  mm<sup>3</sup> ;
- un volume autoradiographique également décrit dans une matrice de  $479 \times 420 \times 120$  pixels environ et dont la taille de ceux-ci est  $0,021 \times 0,021 \times 0,080$  mm<sup>3</sup>.

---

g. BrainRAT (Brain Reconstruction and Analysis Toolbox of BrainVISA) est une nouvelle boîte à outils BrainVISA, logiciel téléchargeable gratuitement (<http://brainvisa.info/>)

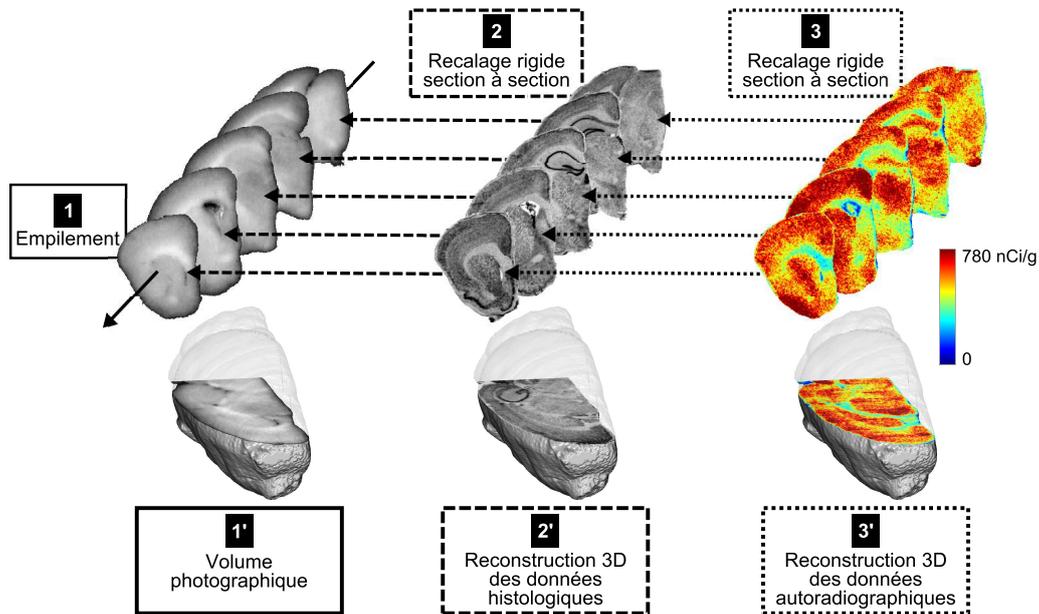


Figure 2.6 – Reconstruction tridimensionnelle des données post mortem. Les photographies ont d’abord été empilées (1) pour fournir un volume photographique spatialement cohérent (1’). Les coupes histologiques et autoradiographiques numérisées ont ensuite été individualisées et empilées grâce à l’outil BrainRAT de BrainVISA. Chaque coupe histologique a ensuite été réalignée, par transformation rigide, avec la photographie lui correspondant (2) ; un volume histologique spatialement cohérent et dans le même référentiel spatial que le volume photographique a été obtenu (2’). Chaque coupe autoradiographique a été enfin réalignée, par transformation rigide, avec la coupe histologique lui correspondant (3) ; un volume autoradiographique spatialement cohérent et dans le même référentiel spatial que les volumes photographiques et histologiques a été obtenu (3’).

#### Notes :

- Pour quantifier la prise de glucose cérébrale des souris, l’intensité en niveaux de gris des volumes autoradiographiques a été convertie en valeur d’activité (en nCi/g), en considérant pour étalon les standards radioactifs de  $^{14}\text{C}$  co-numérisés avec les coupes. Des coefficients correctifs, dépendant du poids de l’animal et de l’épaisseur des coupes prélevées, ont été ensuite appliqués pour normaliser les activités cérébrales et permettre ainsi les comparaisons inter-groupe (Reiman et al., 2000; Valla et al., 2006).
- L’ensemble des opérations de traitements d’images mis en œuvre dans ce travail de thèse a été implémenté en C/C++ en utilisant les bibliothèques développées au sein de l’I<sup>2</sup>BM (AIMS)<sup>h</sup>. Sauf mention contraire, il en est de même pour tous les traitements d’images appliqués pour ce projet de thèse et décrits dans la suite de ce manuscrit.

h. Analyse d’Images Médicales et Séquences

Les laboratoires du LONI et CIVM ont distribué des atlas numériques 3D de cerveau de souris. Construits de différentes façons, nous les avons utilisés pour développer et valider notre stratégie d'analyse d'images post mortem 3D par atlas. Cette approche d'analyse a été élaborée sur un jeu de données obtenu dans le cadre d'une étude préliminaire sur la maladie d'Alzheimer et constitué de 3 animaux contrôles (souris PS1) et des 4 souris pathologiques (APP/PS1). Pour chacun de ces animaux, des volumes photographiques, histologiques (créés à partir de coloration des coupes au violet de cresyl) et autoradiographiques (obtenus après révélation de 2-DG injecté in vivo) ont été créés dans le laboratoire. L'ensemble de ces données est illustré en figure 2.7. La méthode proposée implique le recalage de l'atlas numérique sur notre jeu de données; la stratégie de recalage de ces données est développée dans le chapitre suivant.

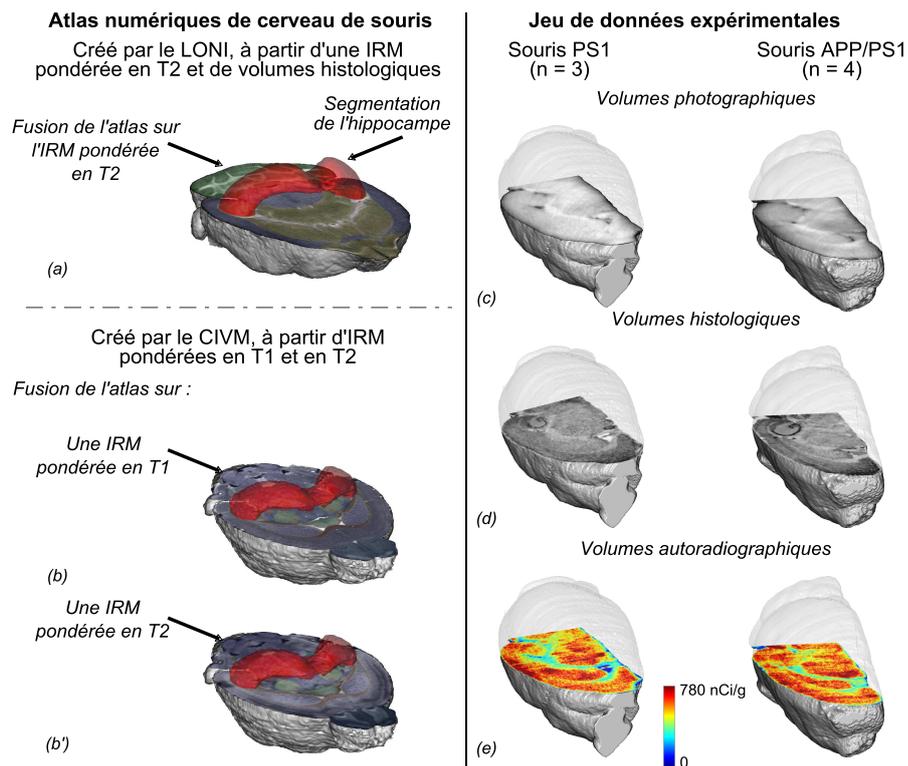


Figure 2.7 – Fusion de l'atlas de cerveau de souris créé par le LONI avec l'IRM utilisée pour le construire (a). Fusions de l'atlas de cerveau de souris créé par le CIVM avec les IRM pondérées en T1 et T2 utilisées pour le construire [respectivement (b) et (b')]. Reconstructions 3D d'images post mortem d'une souris PS1 et d'une APP/PS1 acquises par des techniques photographiques (c), histologiques (d) et autoradiographiques (e).

# Chapitre 3

## Recalage d'un atlas numérique sur des volumes *post mortem* et analyse des données

Ce chapitre décrit et valide la stratégie que nous avons proposée pour recalcer un atlas numérique 3D sur des volumes de données *post mortem* afin de répondre à la problématique d'analyse soulevée au début de ce manuscrit (cf. section 1.6). Pour cela, nous nous sommes appuyés sur l'état de l'art du recalage d'images multimodales présenté en section 1.3. La stratégie élaborée fait l'objet de la première partie de ce chapitre. Nous présentons et discutons des résultats validant qualitativement et quantitativement la faisabilité de notre approche. Des tests ont été effectués pour déterminer lequel des deux atlas décrits en section 2.1 était le plus adéquat pour analyser nos données expérimentales présentées en section 2.2. Enfin, les résultats de l'analyse anatomo-fonctionnelle réalisée sur ces données et obtenus en utilisant l'atlas sélectionné sont présentés et discutés à la fin de ce chapitre. La figure 3.1 présente une vue synthétique de l'organisation de ce chapitre ainsi que des principaux points abordés.

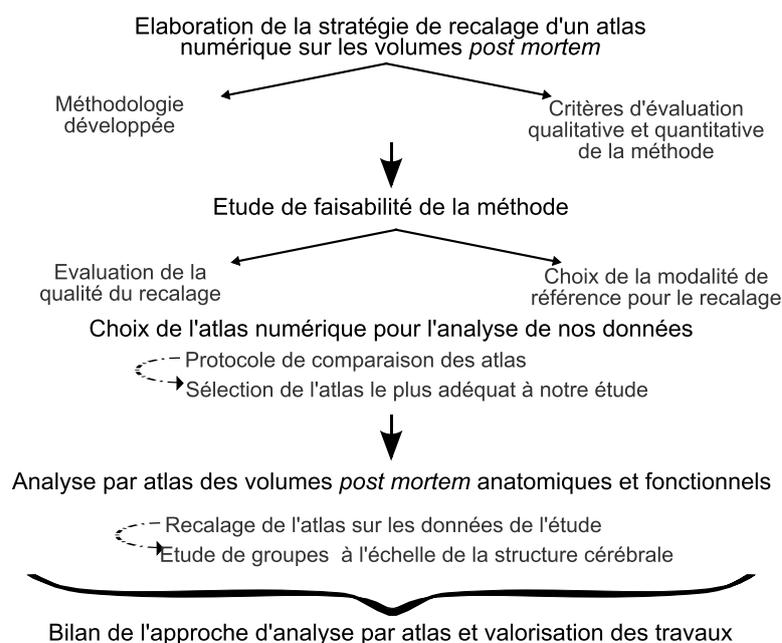


Figure 3.1 – Organisation du chapitre 3 de ce manuscrit et principaux points abordés.

## 3.1 Stratégie de recalage d'un atlas numérique sur des images 3D de cerveaux de souris acquises *post mortem*

Nous avons développé et testé la faisabilité d'une approche d'analyse par atlas d'images 3D de cerveaux de souris acquises *post mortem* en utilisant l'**atlas** créé par le laboratoire du CIVM. Dans cette section, nous parlons donc seulement des données issues de leur projet, à savoir les IRM pondérées en T1 et en T2 et l'atlas créé à partir de ces images (cf. [paragraphe 2.1.2 \(p. 67\)](#)). Des tests ont été effectués par la suite pour déterminer si cet atlas était plus adéquat que celui fourni par le LONI pour analyser nos données expérimentales (voir [section 3.3 \(p. 103\)](#)).

Cet atlas a déjà été utilisé pour mener des analyses morphométriques à partir d'IRM de cerveaux de souris de différentes lignées et âgées en moyenne de 9 semaines ([Badea et al., 2007, 2009](#)). Les **principaux enjeux de mon travail** ont été de :

1. **étudier la faisabilité de recalage** des images acquises *in situ* (les IRM décrites en [paragraphe 2.1.2 \(p. 67\)](#)) sur des images acquises *ex situ* (nos images expérimentales décrites en [section 2.2 \(p. 71\)](#));
2. **évaluer la possibilité d'analyser** des images *post mortem* 3D acquises *ex situ* en utilisant un atlas créé à partir d'IRM acquises *in situ* ;
3. **étudier la faisabilité d'analyser** des images acquises sur des souris âgées d'environ 64 semaines par un modèle numérique généré à partir d'images acquises sur une souris âgée de 9 semaines.

### 3.1.1 Traitements préliminaires de l'atlas

Le principe de l'analyse par atlas a consisté à mettre en correspondance un modèle numérique et une image expérimentale à étudier. Pour cela, un des volumes IRM utilisés pour générer l'atlas a été recalé avec les images à analyser (cf. [figure 1.20 \(p. 53\)](#)).

Les données à analyser proviennent de demi-cerveaux de souris extraits de la boîte crânienne. Les images acquises sont des photographies des plans de coupe et des numérisations de coupes histologiques et autoradiographiques (cf. [section 2.2 \(p. 71\)](#)). L'atlas utilisé pour élaborer notre approche d'analyse a été créé à partir d'IRM de cerveau entier (cf. [paragraphe 2.1.2 \(p. 67\)](#)). Le champ de vue des images expérimentales était différent de celui des images de l'atlas. Pour éviter de faire converger les algorithmes dans des minima locaux et optimiser le temps de calcul d'appariement des images, des pré-traitements ont été appliqués sur les images de l'atlas. Les différentes étapes sont décrites ci-après.

### 3.1.1.1 Débruitage des IRM

Les IRM pondérées en T1 et en T2 et fournies par le CIVM étaient légèrement bruitées (voir figures 2.3(a) et (b)). Ce phénomène est une source potentielle de divergence de l'algorithme de recalage. Pour s'en affranchir sans pour autant modifier la dynamique des images, un **filtre médian**  $3 \times 3 \times 3$  a été appliqué aux **IRM** (cf. figure 3.2). L'avantage de cette opération est qu'elle ne crée pas de nouvelles valeurs. Ainsi, les zones de discontinuité et les contrastes des structures sont préservés.

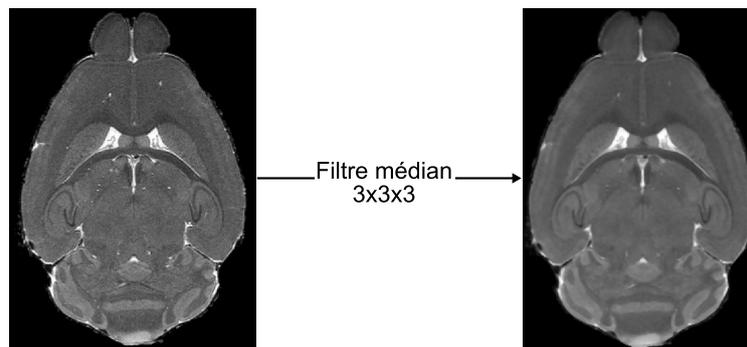


Figure 3.2 – Filtre médian appliqué aux IRM pour réduire le bruit présent dans ces images (ici image pondérée en T1 en vue axiale).

### 3.1.1.2 Régularisation des segmentations de l'atlas

L'atlas proposé par l'équipe du CIVM présentait quelques artéfacts. Certains pixels ont été labellisés comme appartenant à une structure différente de celle(s) représentée(s) par les pixels avoisinants. Pour corriger cette classification erronée des pixels qui donne un aspect discontinu et bruité à l'image de labels (voir cercles rouges dans la figure 3.3), un **filtre majoritaire**  $3 \times 3 \times 3$  a été appliqué à l'**atlas**. Cette opération consiste à recenser dans un voisinage d'un pixel (noté  $P_i$ ) les labels présents et le nombre de pixels correspondants. La valeur affectée au pixel  $P_i$  est celle de la classe dominante de son entourage. Les structures de taille importante sont favorisées par un tel traitement aux dépens des structures petites et fines dont les tailles et épaisseurs sont de l'ordre de la taille du filtre. Après traitement, les contours des régions cérébrales apparaissent plus réguliers et les décrochages précédemment observés ont disparu (cf. cercles verts dans la figure 3.3).

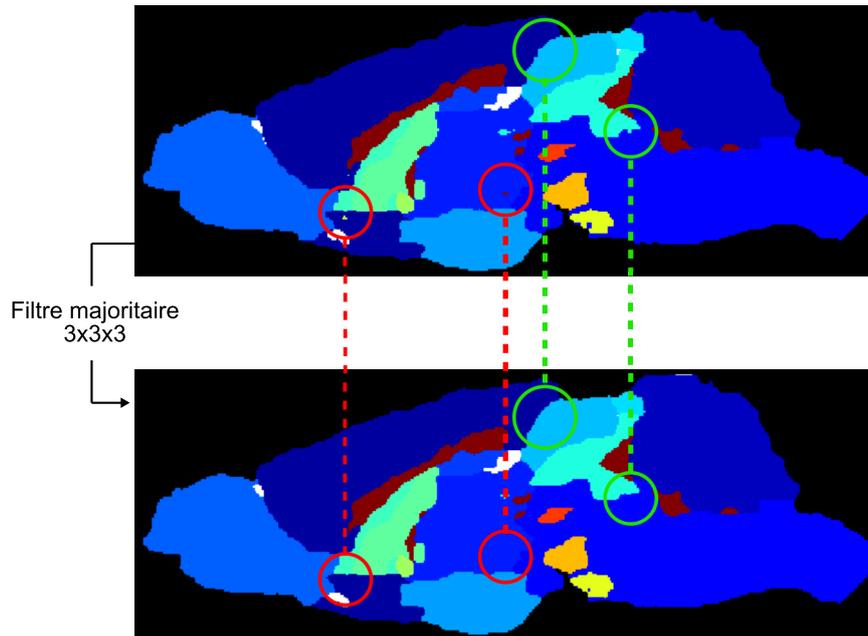


Figure 3.3 – Filtre majoritaire appliqué à l’atlas (ici vu sous incidence sagittale) pour régulariser les segmentations. Les cercles rouges et verts mettent respectivement en évidence les effets de ce filtre : la réduction de l’aspect bruité et des contours irréguliers de certaines structures dus à une classification imparfaite des pixels dans l’atlas initial.

### 3.1.1.3 Redressement du plan inter-hémisphérique

Le plan inter-hémisphérique des IRM et de l’atlas présentait une légère inclinaison par rapport à la normale de l’axe  $X$  de notre référentiel défini par le logiciel de visualisation Anatomist (Rivière et al., 2003). Pour faciliter par la suite l’extraction de la zone à recalcr, opération décrite en paragraphe 3.1.1.4 (p. 82), nous avons redressé l’ensemble de ces images. Pour ce faire, nous avons utilisé un algorithme développé par notre équipe qui s’appuie sur les travaux de Prima (Prima et al., 2002). L’idée principale a consisté à créer une image symétrique de l’originale par rapport à l’axe que nous souhaitons définir comme le nouveau plan inter-hémisphérique (dans notre cas l’axe  $x = \text{dim}X/2$ , où  $\text{dim}X$  est la dimension en  $x$  de l’image). Nous avons estimé ensuite la transformation  $T$  qui permet de recalcr de façon rigide l’image originale sur l’image symétrique et nous avons appliqué la transformation  $T_{1/2}$  à l’image originale telle que  $T_{1/2} \circ T_{1/2} = T$ .

### 3.1.1.4 Adaptation du champ de vue

#### *Extraction du cerveau sur les IRM*

Les IRM cérébrales mises à disposition ont été acquises *in situ*, *i.e.* dans la boîte crânienne. Malgré les opérations de morphologie mathématique utilisées par l'équipe du CIVM pour extraire les cerveaux des IRM (voir paragraphe 2.1.2.2 (p. 68)), des fluides cérébraux ont subsisté dans les images (voir flèches vertes sur la figure 3.4(a)). Pour les retirer des images, nous avons masqué les IRM en utilisant le volume de labels (voir flèches vertes sur la figure 3.4(b)).

#### *Extraction de la zone à apparier avec les données expérimentales*

Le dernier pré-traitement appliqué aux IRM et à l'atlas a été l'extraction du champ de vue équivalent à celui des données expérimentales, à savoir un hémisphère privé de son bulbe olfactif, partie antérieure du cerveau, et de son cervelet, partie postérieure du cerveau (voir figure 2.4 (p. 73)).

Après redressement du plan inter-hémisphérique, ce dernier a coïncidé avec l'axe  $x = \dim X / 2$ . Nous avons donc pu extraire automatiquement chaque hémisphère. Les images ayant été acquises sur une souris sauvage, les hémisphères ont été considérés symétriques. Les extractions du bulbe olfactif et du cervelet ont été réalisées interactivement sur l'IRM pondérée en T1 en utilisant BrainVISA et Anatomist et cela en se basant sur les images de la base de données à analyser (voir cadre rouge sur la figure 3.4(b)). Le champ de vue du résultat obtenu est similaire à celui des nos images expérimentales (cf. figures 3.4(c) et 3.4(d)). Les paramètres d'extraction du volume d'intérêt enregistrés, les opérations d'extraction de la zone à recalculer sur l'IRM pondérée en T2 et sur l'atlas ont été réalisées automatiquement.

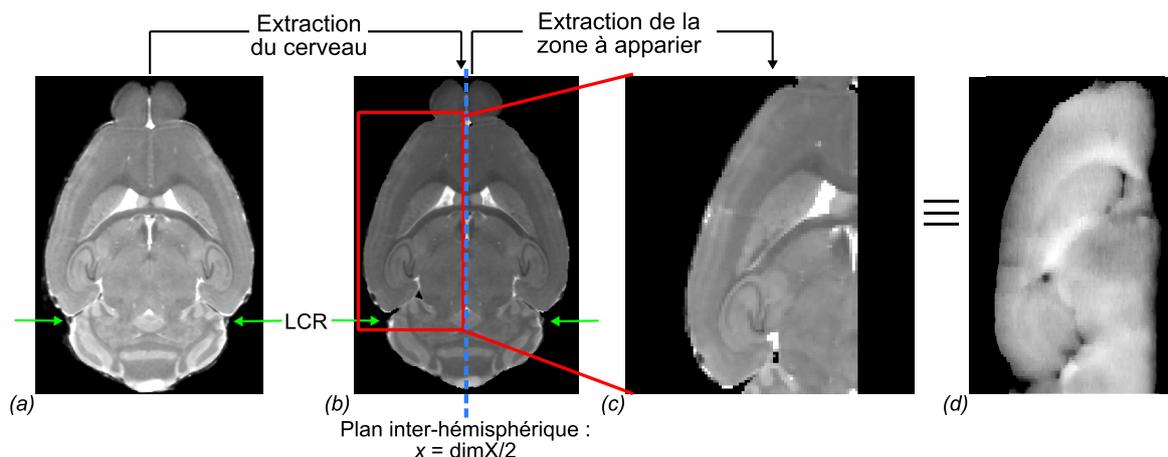


Figure 3.4 – Vue axiale de l’IRM pondérée en T1 avant (a) et après (b) extraction des fluides cérébraux restants (liquide céphalo-rachidien (LCR) pointé par les flèches vertes). Extraction automatique de l’hémisphère à considérer grâce au plan inter-hémisphérique situé à  $x = \text{dimX}/2$  (ligne bleue pointillée sur (b)). Extraction interactive de la zone à apparier (cadre rouge sur (b)). Le champ de vue final (c) est similaire à celui des nos images expérimentales ((d), vue axiale d’un volume photographique de notre base de données).

### 3.1.2 Méthodologie de recalage développée

Pour appliquer les segmentations de l’atlas sur les volumes *post mortem* de notre base de données, il a été nécessaire de mettre en correspondance les IRM sur les volumes à analyser. Les IRM pondérées en T1 et en T2 étant dans le même référentiel (cf. paragraphe 2.1.2.2 (p. 68)) et les volumes photographiques, histologiques et autoradiographiques étant eux aussi dans un même référentiel (cf. paragraphe 2.2.3.2 (p. 75)), une seule transformation permettant de recaler une des deux IRM sur un des trois volumes de la base a été estimée.

#### 3.1.2.1 Détermination des modalités à mettre en correspondance

L’IRM pondérée en T1 est une image dite anatomique (cf. paragraphe 1.2.2.2 (p. 17)). Le contraste tissulaire y est plus important que sur une IRM pondérée en T2. De plus, l’image anatomique fournie par le CIVM présentant moins d’artéfacts que l’IRM pondérée en T2 (voir figures 2.3(a) et (b) (p. 69)), elle a été choisie pour estimer le champ de déformation.

Les volumes *post mortem* ont été construits en se basant sur la **modalité photographique** car le volume créé en empilant les photographies est spatialement cohérent (cf. paragraphe 2.2.3.1 (p. 73)). L’image photographique étant par ailleurs plus semblable à l’IRM que les images produites par les techniques de marquage histologique et autoradiographique, elle a été choisie comme image de référence pour l’estimation du champ de déformation.

La mise en correspondance d'IRM avec des images photographiques reconstruites en 3D a déjà été proposée dans les travaux de Yelnik *et al.* et Dauguet *et al.* (Yelnik *et al.*, 2007; Dauguet *et al.*, 2007). Des transformations affines et non affines ont été respectivement utilisées par ces équipes. Des volumes IRM ont également été mis en correspondance avec des volumes autoradiographiques (Malandain *et al.*, 2004) et histologiques (Schormann *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2005a; Chakravarty *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009). Aussi, ayant à disposition les trois modalités *post mortem* reconstruites en 3D (photographique, histologique et autoradiographique), une étude méthodologique a consisté à tester chacune de ces trois modalités comme image de référence pour le recalage de l'IRM afin de déterminer la modalité la plus adaptée (voir figure 3.5).

### 3.1.2.2 Transformations géométriques utilisées

Les images à recalcer (IRM pondérée en T1 et volumes *post mortem*) ont été acquises sur des animaux d'âges différents et dans des conditions expérimentales différentes. Malgré le pré-traitement appliqué aux images de l'atlas pour obtenir un champ de vue similaire à celui des données à analyser (cf. paragraphe 3.1.1.4 (p. 82)), les hémisphères à mettre en correspondance différaient en positionnement dans l'espace et en taille. Aussi, la stratégie de recalage de l'atlas sur les données expérimentales a dû être capable de :

1. positionner les cerveaux dans une même orientation ;
2. compenser les différences de volumes entre les hémisphères étudiés.

Pour s'affranchir de la variabilité des sujets à mettre en correspondance, plusieurs équipes ont précédemment proposé de **recaler leurs images en augmentant progressivement le nombre de degrés de liberté des transformations géométriques** appliqué à l'image à recalcer (Bock *et al.*, 2006; Badea *et al.*, 2007; Dauguet *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Maheswaran *et al.*, 2009a). Nous nous sommes inspirés de ces travaux pour mener cette étude.

**La mise en correspondance de l'IRM avec nos volumes *post mortem* a été effectuée en trois étapes :**

1. Une **transformation rigide** a d'abord été estimée par une approche globale et optimisée par la méthode de Powell (cf. paragraphes 1.3.4.1 (p. 27) et 1.3.5.3 (p. 33)). Les images à apparier n'étant pas de même modalité, l'**information mutuelle** a été utilisée comme critère de similarité (voir équation 1.8 (p. 33) et Viola and Wells (1997)). Les six paramètres de rotation et de translation de cette transformation ont permis d'aligner l'IRM avec le volume à analyser.

2. Une **transformation affine**, initialisée avec les paramètres précédemment calculés, a ensuite été estimée indépendamment sur des images de l'IRM en utilisant la méthode du **Block Matching** proposée dans [Ourselin et al. \(2001\)](#) (voir paragraphes 1.3.3 (p. 26) et 1.3.4.1 (p. 27)). Ne considérant que des petites parties des images, nous avons supposé qu'il existait une relation linéaire entre les intensités des images à mettre en correspondance. Le **coefficient de corrélation** a donc été utilisé comme critère de similarité pour appairer ces volumes (cf. équation 1.6 (p. 32)). De plus, pour minimiser le risque de tomber dans un minimum local, une approche pyramidale, avec trois niveaux d'échantillonnage, a été adoptée (cf. paragraphe 1.3.3 (p. 26)). Les paramètres de changement d'échelle et de cisaillement de cette transformation géométrique ont permis de compenser les différences volumétriques les plus importantes.
3. Enfin, pour améliorer localement le recalage, la **transformation non-affine *Free Form Deformation*** (cf. équation 1.3 (p. 28)) a été initialisée avec les paramètres précédemment calculés et estimée par une approche globale. Cette méthode de recalage a été proposée par Rueckert et al et Mattes et al. ([Rueckert et al., 1999](#); [Mattes et al., 2003](#)) et précédemment utilisée avec succès par les membres de notre équipe pour recalibrer des images *post mortem* acquises sur des animaux ([Delzescaux et al., 2003](#); [Dauguet, 2005](#); [Dauguet et al., 2007](#)). L'information mutuelle a été utilisée comme critère de similarité pour cette étape (cf. équation 1.8 (p. 33)). L'algorithme L-BFGS a été utilisé pour optimiser la mesure (voir paragraphe 1.3.5.3 (p. 33)). Cette transformation élastique a permis de déformer l'IRM en utilisant  $p \times q \times r$  points de contrôle, positionnés sur l'ensemble du volume selon les directions  $x$ ,  $y$  et  $z$ . Avec  $p = q = r = 10$ , nous avons disposé de 3000 degrés de liberté pour compenser localement les différences entre les deux hémisphères à mettre en correspondance.

La stratégie de recalage proposée pour mettre en correspondance l'IRM pondérée en T1 avec les données *post mortem* s'est donc effectuée en trois étapes. Des tests supplémentaires ont pu être réalisés pour déterminer si une combinaison d'images de référence permettait d'obtenir de meilleurs résultats. Pour chaque étape du recalage, les volumes expérimentaux ont été testés et celui fournissant le meilleur recalage a été choisi pour réaliser le recalage.

Afin d'enchaîner automatiquement les trois étapes de recalage, un script python intégré dans BrainVISA a été développé.

La [figure 3.5](#) synthétise la stratégie de recalage proposée pour mettre en correspondance l'atlas numérique créé à partir d'IRM de cerveau entier de souris avec des images *post mortem* de demi-cerveaux de souris reconstruites en 3D.

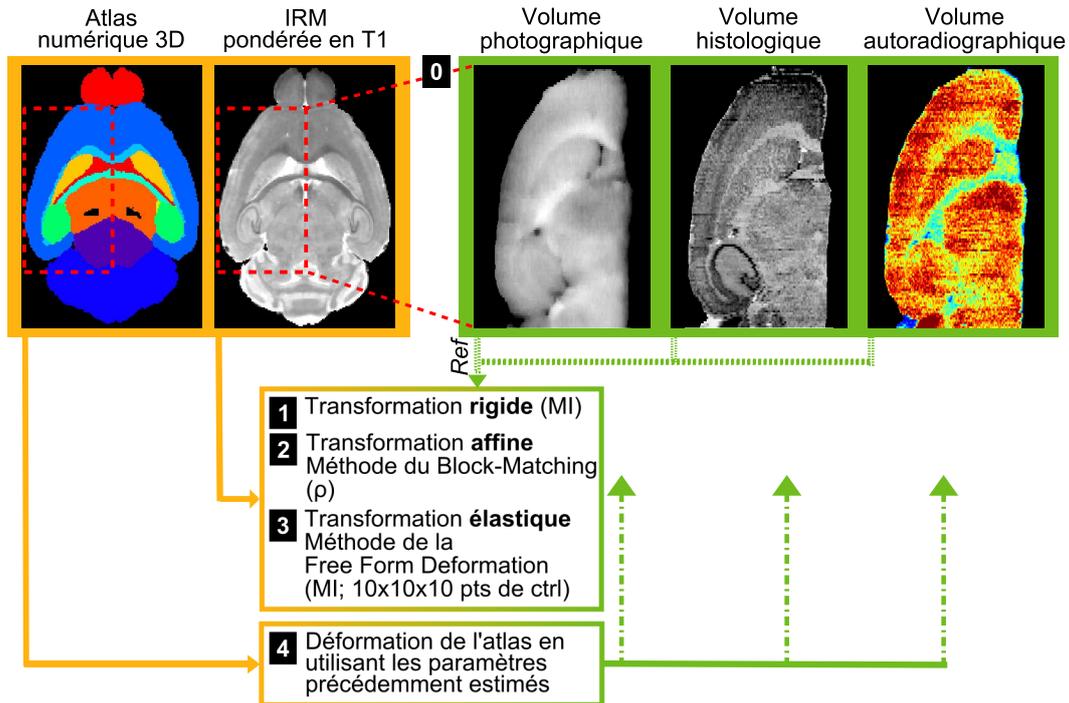


Figure 3.5 – Stratégie de recalage d'un atlas numérique créé à partir d'IRM de cerveau entier de souris avec des images post mortem de demi-cerveaux de souris reconstruites en 3D. Une transformation rigide (1), optimisée en utilisant l'information mutuelle (MI), a d'abord été estimée pour recaler la partie de l'IRM correspondant à nos données post mortem (0). Une transformation affine (2), initialisée par les paramètres précédemment obtenus, a ensuite été estimée par la méthode du Block Matching et optimisée par le coefficient de corrélation ( $\rho$ ). Une transformation élastique (3), initialisée par les paramètres précédemment obtenus, a enfin été estimée en utilisant la méthode de la Free Form Deformation. L'information mutuelle (MI) a été utilisée pour optimiser 3 ddl en chaque point (pt) de contrôle (ctrl) positionné sur l'image ( $10 \times 10 \times 10$ ). Les volumes photographiques, histologiques et autoradiographiques ont successivement été considérés comme image de référence pour chaque étape du recalage. Les paramètres de déformation estimés ont été appliqués à la partie de l'atlas numérique 3D correspondant à nos données (4).

### 3.1.3 Critères d'évaluation qualitative et quantitative de la méthode de recalage

La mise en correspondance de l'IRM et de l'atlas associé avec nos volumes expérimentaux a été évaluée à chaque étape du recalage pour juger du bon appariement des données et de l'amélioration du recalage. Ces évaluations ont été réalisées sur deux souris de l'étude appartenant chacune à un groupe différent (une souris PS1 et une APP/PS1) afin de confirmer que l'approche pouvait être appliquée sur des lignées de souris transgéniques différentes.

#### 3.1.3.1 Evaluation qualitative

La première évaluation des recalages a été réalisée visuellement. Pour cela, les contours de l'IRM, obtenus en utilisant un filtre de Deriche (cf. [paragraphe 1.4.2.2 \(p. 41\)](#)), ont été superposés aux images histologiques associées à nos deux souris. Les correspondances des **contours externes** et **internes** ont été vérifiées pour évaluer si les données étaient globalement bien positionnées et si les structures internes, comme le corps calleux ou l'hippocampe, se superposaient correctement.

#### 3.1.3.2 Evaluation quantitative

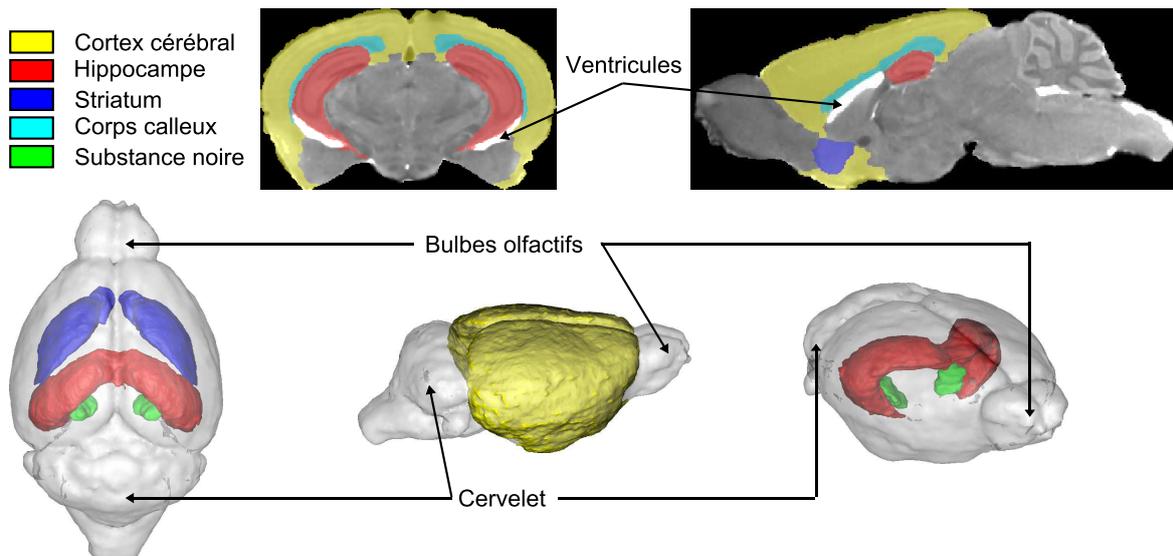
Afin d'évaluer quantitativement la qualité des recalages, quelques segmentations de l'atlas à des segmentations manuelles réalisées par un expert en neuroanatomie sur les volumes histologiques d'une souris PS1 (souris contrôle) et d'une souris APP/PS1 (souris modèle de la maladie d'Alzheimer) ont été comparées à l'aide de critères de superposition décrits en [paragraphe 1.3.6.2 \(p. 35\)](#). Les scores obtenus à la fin du processus de recalage ont également permis de valider l'utilisation d'un tel atlas pour analyser des images anatomiques et fonctionnelles acquises *post mortem* et reconstruites en 3D.

Le choix des structures à étudier a été déterminé selon plusieurs critères :

- les structures devaient être déjà définies par les segmentations de l'atlas et facilement segmentables sur les images anatomiques ;
- les structures étudiées devaient être représentatives de l'ensemble des structures cérébrales de par leur localisation dans le cerveau et leur taille et ce, afin d'évaluer les recalages dans différentes conditions.

Les structures choisies pour évaluer quantitativement les recalages ont donc été les suivantes :

1. **le cortex cérébral**, structure paire<sup>a</sup> de grande taille qui s'étend sur la quasi totalité du cerveau (des bulbes olfactifs au cervelet) (représenté en jaune sur la [figure 3.6](#)) ;
2. **l'hippocampe**, structure paire sous-corticale, de taille plus petite, de forme complexe (en forme de corne dite d'*Amon*<sup>b</sup>), principalement située dans la partie postérieure du cerveau (représenté en rouge sur la [figure 3.6](#)) ;
3. **le striatum**, structure paire sous-corticale dont la taille est du même ordre de grandeur que l'hippocampe mais de forme plus simple et située dans la partie antérieure du cerveau (représenté en bleu sur la [figure 3.6](#)) ;
4. **le corps calleux**, structure impaire<sup>c</sup>, très fine et située entre le cortex cérébral et les ventricules (représenté en turquoise sur la [figure 3.6](#)) ;
5. **la substance noire**, structure paire de petite taille, sous-thalamique, profonde, située dans la partie postérieure du cerveau (représentée en vert sur la [figure 3.6](#)).



*Figure 3.6 – Illustration sur un plan coronal (en haut à gauche), sagittal (en haut à droite) ou par rendus surfaciques (en bas) des structures cérébrales définies dans l'atlas : le cortex cérébral (jaune), l'hippocampe (rouge), le striatum (bleu), le corps calleux (turquoise) et la substance noire (vert). Ces structures ont été choisies car elles diffèrent en taille, en localisation et en complexité géométrique.*

a. Une structure paire est constituée de deux composantes appartenant chacune à un hémisphère.  
 b. Zeus-Amon est un dieu gréco-égyptien qui apparaît dans l'iconographie grecque sous forme humaine, les tempes ceintes de cornes de bélier.  
 c. Une structure impaire n'est constituée que d'une seule composante et est centré sur le plan inter-hémisphérique du cerveau.

Afin que les critères de superposition calculés puissent comparer des régions similaires, des modifications ont été apportées aux segmentations de l'atlas. Le striatum par exemple peut être considéré comme la région cérébrale réunissant les structures nommées *caudate putamen* et *accumbens nucleus*. Ces deux structures sont plus contrastées en IRM par rapport à un marquage au violet de crésyl. Aussi, elles peuvent être facilement délimitées sur l'IRM cérébrale de souris mais beaucoup plus difficilement sur des coupes histologiques colorées au violet de crésyl. L'expert en neuroanatomie a donc segmenté la région striatale dans son ensemble et les régions *caudate putamen* et *accumbens nucleus* de l'atlas ont été fusionnées pour créer la région striatale correspondante. Les autres modifications apportées aux segmentations de l'atlas sont décrites en [annexe C](#). (p. 181).

Le [tableau 3.1](#) présente les volumes des régions segmentées sur les volumes histologiques des demi-cerveaux d'une souris PS1 et d'une souris APP/PS1 ainsi que ceux des structures correspondantes définies dans l'atlas.

Structures	Volumes (en mm <sup>3</sup> )		
	Segmentation manuelle Souris PS1	Segmentation manuelle Souris APP/PS1	Segmentation définie dans l'atlas
Cortex	73,55	82,60	84,27
Corps calleux	7,27	6,53	6,47
Hippocampe	13,39	14,98	12,46
Striatum	14,02	13,85	13,15
Substance noire	0,95	0,85	0,89

*Tableau 3.1 – Volumes du cortex cérébral, du corps calleux, de l'hippocampe, du striatum et de la substance noire segmentés manuellement sur un hémisphère d'une souris PS1 (souris contrôle), sur un hémisphère d'une souris APP/PS1 (souris modélisant la maladie d'Alzheimer) et définis dans un hémisphère de l'atlas du CIVM.*

#### *Comparaison des géométries des segmentations*

Pour évaluer les concordances géométriques et spatiales entre les segmentations définies par l'atlas et celles délimitées manuellement par l'expert, les critères de superposition suivants ont été calculés :

- la différence de volumes (cf. [équation 1.9](#) (p. 36)) ;
- le coefficient de Dice (cf. [équation 1.11](#) (p. 36)) ;
- l'index de sensibilité (cf. [équation 1.12](#) (p. 36)).

Des algorithmes codés en C/C++ ont été réalisés pour calculer les critères d'évaluation quantitative de cette étude.

*Comparaison des informations fonctionnelles mesurées par les différentes segmentations*

Pour s'assurer que les segmentations de l'atlas étaient capables de mesurer des grandeurs fonctionnelles similaires à celles que pourrait mesurer un expert, les segmentations définies dans l'atlas et réalisées manuellement ont été reportées sur les images autoradiographiques et les activités moyennes par région ( $\mu_{act}$ ) ont été mesurées et comparées. Tous les volumes *post mortem* étant dans le même référentiel, les segmentations manuelles réalisées sur les images histologiques ont été appliquées sur les données autoradiographiques. Il en a été de même pour les segmentations de l'atlas après recalage, et ce, pour toutes les combinaisons possibles des images de référence.

Le coefficient de variation ( $\delta_\mu$ ) défini par l'équation 3.1 a été calculé pour chacune des cinq structures précédemment citées, afin d'estimer l'erreur des mesures des segmentations de l'atlas recalé ( $\mu_{act(A)}$ ) par rapport à celles obtenues avec les segmentations manuelles ( $\mu_{act(M)}$ ).

$$\delta_\mu = \frac{|\mu_{act(A)} - \mu_{act(M)}|}{\mu_{act(M)}} \quad (3.1)$$

## 3.2 Etude de faisabilité de la méthode de recalage

L'étude de faisabilité de notre méthode a été réalisée sur une souris PS1 et une APP/PS1.

### 3.2.1 Evaluation des étapes du recalage

Des transformations rigides, affines puis élastiques ont été estimées pour mettre l'IRM pondérée en T1 en correspondance avec les volumes *post mortem* expérimentaux. Les paramètres de recalage précédemment obtenus ont ensuite été appliqués à l'atlas 3D pour que ses segmentations puissent délimiter automatiquement des régions cérébrales sur les volumes expérimentaux. L'ensemble de ces opérations a été réalisé en moins de 30 min pour chaque animal<sup>d</sup>.

Dans un premier temps, nous avons considéré la **modalité photographique comme référence pour le recalage**. Les résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus sont présentés ci-dessous.

#### 3.2.1.1 Evaluation qualitative

Les recalages de l'IRM sur les souris PS1 et APP/PS1 ont donné des résultats qualitatifs similaires. Nous présentons uniquement ceux obtenus sur une la souris APP/PS1.

La [figure 3.7](#) montre la superposition des contours de l'IRM pondérée en T1 (en blanc sur la figure) avec le volume histologique acquis sur une souris APP/PS1. La fusion de ces images illustre la superposition des données avant toute transformation (cf. [figure 3.7\(a\)](#)) et après chaque étape de la stratégie de recalage proposée, *i.e.* après l'estimation des transformations rigides (cf. [figure 3.7\(b\)](#)), affines (cf. [figure 3.7\(c\)](#)) et élastiques (cf. [figure 3.7\(d\)](#)). Les flèches pleines numérotées 1 (pointées vers les contours externes) des [figures 3.7\(a\)](#) et [3.7\(b\)](#) montrent bien que les paramètres de la **transformation rigide** ont permis de **réorienter** l'IRM dans l'axe des données expérimentales et de **centrer ces images**. Ces mêmes flèches montrent, sur les [figures 3.7\(b\)](#) et [3.7\(c\)](#), que les **différences de volumes les plus importantes**, notamment au niveau de l'enveloppe externe, ont été **corrigées après l'estimation de la transformation affine**. Les **variations plus locales** ont ensuite été **compensées** grâce à la **déformation élastique** de l'IRM. En effet, dans la [figure 3.7\(d\)](#), nous observons que les contours des structures externes (flèches pleines  $n^{\circ} 1$ ) aussi bien que ceux des structures internes telles que le corps calleux (flèches pleines  $n^{\circ} 2$ ) ou l'hippocampe (flèches pleines  $n^{\circ} 3$ ) de l'IRM se superposent correctement à ces mêmes régions bien mises en évidence par le marquage au violet de crésyl.

---

d. Ces tests ont été réalisés sur un Intel<sup>®</sup> Xeon<sup>®</sup> CPU 5150 à 2,66GHz.

Pour avoir une idée des parties de l'IRM les plus déformées au cours de ces opérations, nous avons également appliqué les paramètres de déformation à une grille constituée de plans initialement équidistants et perpendiculaires entre eux. La figure 3.7(e) nous montre qu'à la fin du processus de recalage, les **structures externes** de l'IRM ont été **plus fortement déformées que les structures internes** pour apparier correctement l'atlas avec les données expérimentales (flèches pointillées n° 1).

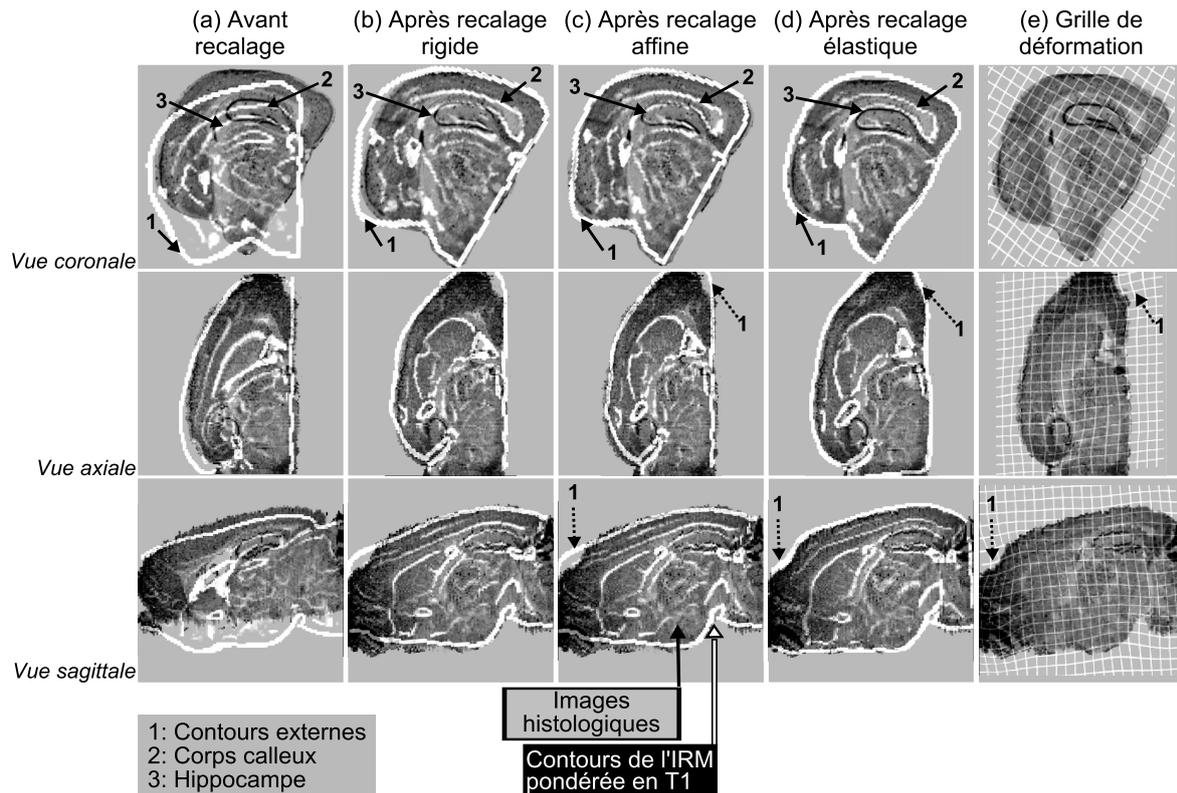


Figure 3.7 – Évaluation qualitative du recalage de l'IRM pondérée en T1 sur les volumes expérimentaux par superposition des contours de cette image (en blanc) sur des images histologiques acquises sur une souris APP/PS1 avant (a) et après chaque étape du recalage : après les transformations rigides (b), affines (c) et élastiques (d). Le volume photographique a été utilisé comme image de référence pour ce recalage. Les contours externes (flèches pleines n° 1) en (b) montrent que la transformation rigide a permis de centrer les deux images. En (c), ces contours montrent que la transformation affine a permis de compenser les principales différences volumétriques entre les données. En (d), nous observons que la transformation élastique a permis d'ajuster localement les différences restantes entre les données (se reporter aux contours des structures externes (flèches pleines n° 1) et à ceux des structures internes (corps calleux pointé par la flèche pleine n° 2 et hippocampe pointé par la flèche pleine n° 3)). La grille en (e) montre que les déformations les plus importantes à la fin du recalage ont lieu au niveau des structures externes (flèches pointillées n° 1).

### 3.2.1.2 Evaluation quantitative

#### *Comparaison des géométries des segmentations*

Le [tableau 3.2](#) présente les différences de volumes ([tableau 3.2\(a\)](#)), les coefficients de Dice ([tableau 3.2\(b\)](#)) et les index de sensibilité ([tableau 3.2\(c\)](#)) calculés entre les segmentations de l'atlas et celles réalisées manuellement sur une souris PS1 (souris contrôle) et une souris APP/PS1 (souris modélisant la maladie d'Alzheimer) représentant le cortex cérébral, le corps calleux, l'hippocampe, le striatum et la substance noire. Ces critères de superposition ont été calculés avant et après chaque transformation estimée (rigide, affine et élastique) pour recalculer l'IRM sur le volume photographique de ces deux souris.

	Souris PS1 (ctrl)				Souris APP/PS1 (modèle MA)			
	Init	Rig	Aff	Elast	Init	Rig	Aff	Elast
<b>(a) Différences de volumes</b>								
Cortex	0,14	0,14	0,03	0,03	0,02	0,02	0,06	0,09
Corps calleux	0,12	0,12	0,28	0,29	0,02	0,02	0,10	0,08
Hippocampe	0,08	0,08	0,24	0,18	0,19	0,19	0,27	0,15
Striatum	0,06	0,06	0,23	0,08	0,06	0,06	0,14	0,05
Substance noire	0,05	0,05	0,22	0,26	0,08	0,08	0,02	0,01
<b>(b) Coefficients de Dice</b>								
Cortex	0,44	0,76	0,79	0,83	0,56	0,79	0,81	0,85
Corps calleux	0,08	0,42	0,48	0,54	0,09	0,41	0,42	0,58
Hippocampe	0,38	0,82	0,79	0,83	0,41	0,82	0,82	0,86
Striatum	0,45	0,80	0,81	0,83	0,47	0,79	0,81	0,81
Substance noire	0,12	0,67	0,54	0,47	0,57	0,50	0,51	0,57
<b>(c) Index de sensibilité</b>								
Cortex	0,48	0,82	0,78	0,82	0,57	0,80	0,78	0,82
Corps calleux	0,07	0,40	0,42	0,47	0,09	0,41	0,40	0,56
Hippocampe	0,36	0,79	0,70	0,76	0,37	0,75	0,72	0,80
Striatum	0,44	0,78	0,73	0,80	0,45	0,77	0,76	0,79
Substance noire	0,11	0,65	0,49	0,41	0,59	0,52	0,50	0,57

Tableau 3.2 – Critères de superposition ((a) Différences de volumes, (b) Coefficients de Dice et (c) Index de sensibilité) calculés avant (Init) et après chaque transformation estimée (rigide (Rig), affine (Aff) et élastique (Elast)), entre cinq segmentations de l'atlas et celles réalisées manuellement sur une souris PS1 (souris contrôle "ctrl") et une souris APP/PS1 (souris modélisant la maladie d'Alzheimer "MA") : segmentations du cortex cérébral, du corps calleux, de l'hippocampe, du striatum et de la substance noire. Les scores finaux moyens (différences de volumes  $\sim 10\%$ , index de Dice et de sensibilité  $\gtrsim 0,70$ ) montrent que cet atlas a été capable de classer correctement les pixels de nos volumes expérimentaux dans les structures cérébrales adéquates.

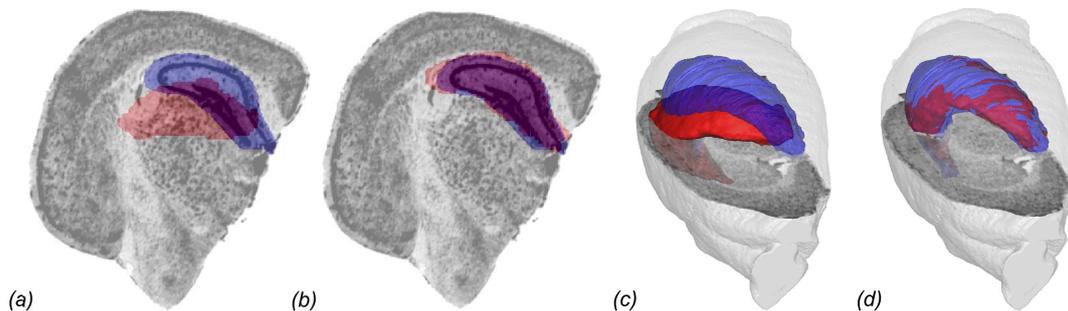
Globalement, pour chaque structure segmentée, les critères de superposition varient de la même façon pour les deux souris transgéniques étudiées. Les gains observés pour les index de Dice et de sensibilité après la transformation rigide reflètent le centrage global des données comme illustré en [figure 3.7\(b\)](#). Les coefficients de Dice obtenus pour les structures de grande taille (cortex, hippocampe et striatum) sont supérieurs à 0,70. Ceci montre qu'après l'estimation de cette transformation, les segmentations des structures majeures se correspondent déjà bien dans l'espace. Cette superposition a ensuite été améliorée grâce aux paramètres de facteurs d'échelles et de cisaillements de la transformation affine estimée (gain moyen de ce coefficient  $\sim 0,5$  % entre les recalages rigides et affines). Ces paramètres ont en revanche dégradé la similitude entre les tailles des segmentations (représentée par la différence de volumes) et augmenté le nombre de faux négatifs (représenté par l'index de sensibilité) : entre les recalages rigides et affines, la différence de volumes entre les segmentations a augmenté en moyenne de  $\sim 175$  % et l'index de sensibilité a perdu en moyenne  $\sim 5$  %. Ces pertes ont pu être compensées grâce aux  $3 \times 10^3$  degrés de liberté de la transformation élastique estimée à la fin de la stratégie de recalage. En effet, entre les recalages affines et élastiques, la différence de volumes entre les segmentations a diminué de  $\sim 23$  % en moyenne et l'index de sensibilité a lui augmenté de  $\sim 9$  %. Le coefficient de Dice a profité également de ces ajustements locaux et les scores obtenus après le recalage élastique sont en moyenne  $\sim 7$  % plus élevés que ceux obtenus après le recalage affine.

Les différences de volumes finales montrent que l'atlas a été capable de mesurer, sur une reconstruction 3D d'images *post mortem*, le volume :

- du cortex cérébral avec une moyenne des erreurs de 6 % (ce qui représente  $\sim 5 \text{ mm}^3$  pour un hémisphère) ;
- du corps calleux avec une moyenne des erreurs de 18 % (ce qui représente  $\sim 1 \text{ mm}^3$  pour un hémisphère) ;
- de l'hippocampe avec une moyenne des erreurs de 17 % (ce qui représente  $\sim 2 \text{ mm}^3$  pour un hémisphère) ;
- du striatum avec une moyenne des erreurs de 6 % ; (ce qui représente  $\sim 1 \text{ mm}^3$  pour un hémisphère) ;
- de la substance noire avec une moyenne des erreurs de 14 % (ce qui représente  $\sim 0,2 \text{ mm}^3$  pour un hémisphère).

Les index finaux de Dice et de sensibilité sont respectivement  $\sim 0,72$  et  $\sim 0,68$  en moyenne. Ces scores attestent de la capacité de l'atlas à classer correctement les pixels de nos volumes expérimentaux dans les principales structures cérébrales. **Nous avons donc pu utiliser cet atlas pour segmenter automatiquement les structures cérébrales d'une reconstruction 3D d'images *post mortem*.**

Pour illustrer la mise en correspondance de ces segmentations, les tracés de l'hippocampe définis dans l'atlas et réalisés manuellement sur la souris APP/PS1 ont été superposés avant et après recalage et visualisés en 2D et en 3D. Sur la [figure 3.8](#), nous observons qu'après recalage les deux segmentations de cette structure de forme complexe étaient bien superposées dans l'espace. Cette illustration indique également que l'erreur de mesure du volume de l'hippocampe était distribuée de façon homogène tout autour de la structure. Ces mêmes observations ont été faites pour toutes les structures segmentées manuellement afin d'évaluer la qualité de notre stratégie de recalage.



*Figure 3.8 – Superposition de la segmentation de l'hippocampe de l'atlas (en rouge) sur la segmentation manuelle de cette structure (en bleu) réalisée sur un volume histologique d'un cerveau de souris APP/PS1, avant ((a) et (c)) et après recalage ((b) et (d)) de l'atlas sur ce volume expérimental. Les figures (a) et (b) représentent les projections de ces segmentations sur une coupe histologique. Les figures (c) et (d) représentent les rendus surfaciques de ces segmentations sur un rendu surfacique du volume histologique. Cette figure montre qu'après recalage, les deux segmentations de cette structure de forme complexe sont bien superposées dans l'espace.*

#### *Comparaison des informations fonctionnelles mesurées par les différentes segmentations*

L'activité cérébrale a été mesurée à l'intérieur de chaque structure segmentée par l'atlas  $\mu_{act(A)}$  et comparée à celle mesurée après segmentation manuelle  $\mu_{act(M)}$ . Le [tableau 3.3](#) montre ces activités (en nCi/g) pondérées par leur écart-type (SD pour *Standard Deviation* en anglais) pour chacune de cinq structures segmentées sur une souris PS1 (voir [tableau 3.3\(a\)](#)) et une souris APP/PS1 (voir [tableau 3.3\(b\)](#)). Les coefficients de variation ( $\delta_\mu$ ) ont également été calculés entre les activités appariées. Les résultats présentés dans ce tableau montrent que les différences de mesure d'activité réalisées par les deux approches de segmentation sont globalement non significatives ( $\delta_\mu \leq 5\%$ ). A l'exception du cas du corps calleux de la souris PS1, les segmentations de l'atlas ont fourni une activité moyenne par structure du même ordre de grandeur que celles estimées par les segmentations manuelles.

	$\mu_{act(M)} \pm SD$ (nCi/g)	$\mu_{act(A)} \pm SD$ (nCi/g)	$\delta_\mu$
<b>(a) Souris PS1 (ctrl)</b>			
Cortex	265,38 ± 49,58	265,53 ± 48,36	< 0,01
Corps calleux	200,60 ± 38,70	226,82 ± 44,41	0,13
Hippocampe	240,61 ± 40,49	239,31 ± 41,88	0,01
Striatum	268,24 ± 37,75	273,21 ± 33,59	0,02
Substance noire	221,61 ± 33,38	209,95 ± 35,30	0,05
<b>(b) Souris APP/PS1 (modèle MA)</b>			
Cortex	275,96 ± 61,22	279,37 ± 57,61	0,01
Corps calleux	201,44 ± 48,01	208,30 ± 47,63	0,03
Hippocampe	225,88 ± 38,66	225,52 ± 40,06	< 0,01
Striatum	264,53 ± 48,95	276,19 ± 40,87	0,04
Substance noire	187,37 ± 29,07	179,92 ± 26,16	0,04

Tableau 3.3 – Comparaison des activités moyennes des structures cérébrales mesurées par les segmentations manuelles ( $\mu_{act(M)} \pm SD$ ) et celles définies dans l'atlas ( $\mu_{act(A)} \pm SD$ ), avec "SD", l'écart-type mesuré pour chaque segmentation. Les activités (exprimées en nCi/g) ont été mesurées dans le cortex cérébral, le corps calleux, l'hippocampe, le striatum et la substance noire d'une souris PS1 (souris contrôle "ctrl", tableau (a)) et une souris APP/PS1 (souris modélisant la maladie d'Alzheimer "MA", tableau (b)) une fois l'atlas recalé sur les images de ces souris. Les coefficients de variation ( $\delta_\mu$ ) calculés pour chaque structure ont permis d'estimer l'erreur de mesure d'activité des segmentations de l'atlas par rapport aux mesures réalisées avec les segmentations manuelles. Les différences entre les deux mesures sont globalement non significatives ( $\delta_\mu \leq 5\%$ ). Ces résultats montrent que les segmentations de l'atlas ont fourni une activité moyenne par structure du même ordre de grandeur que celles estimées par les segmentations manuelles.

Les résultats exposés aux paragraphes 3.2.1.1 (p. 91) et 3.2.1.2 (p. 93) montrent que la stratégie de recalage proposée pour mettre en correspondance les segmentations d'un atlas numérique 3D sur des reconstructions d'images *post mortem* était bien adaptée à notre étude pour les principales structures cérébrales.

### 3.2.2 Validation du choix de la modalité de référence utilisée pour le recalage

Les résultats présentés dans le [paragraphe 3.2.1 \(p. 91\)](#) ont été obtenus en considérant uniquement les volumes photographiques comme images de référence pour effectuer les étapes successives de recalage. Ayant à notre disposition des volumes histologiques et autoradiographiques pour chaque sujet de la base, nous avons recalé de nouveau l'IRM pondérée en T1 sur nos données en prenant en compte ces autres modalités comme images de référence pour l'estimation des transformations. La stratégie de recalage se décomposant en trois étapes (rigide, affine et élastique), nous avons considéré une seule modalité pour l'ensemble des étapes ou combiné les modalités. Les critères de superposition (différences de volumes, coefficients de Dice et index de sensibilité) ont été calculés. En fonction des scores obtenus pour chacun des tests, nous avons déterminé la(es) modalité(s) à considérer comme image(s) de référence pour chacune des étapes de la stratégie de mise en correspondance de l'atlas numérique sur nos données expérimentales.

Les tests présentés ci-dessous ont été réalisés sur les souris PS1 et APP/PS1 dont cinq structures ont été segmentées manuellement. Les résultats étant similaires pour ces deux animaux, seuls ceux obtenus sur la souris APP/PS1 sont présentés.

#### 3.2.2.1 Recalage de l'IRM pondérée en T1 sur une seule modalité de référence

Dans un premier temps, les transformations rigides, affines et élastiques permettant de recalculer l'IRM pondérée en T1 ont été estimées en considérant uniquement le volume histologique, puis uniquement le volume autoradiographique.

Le [tableau 3.4](#) présente les différences de volumes ([tableau 3.4\(a\)](#)), les coefficients de Dice ([tableau 3.4\(b\)](#)) et les index de sensibilité ([tableau 3.4\(c\)](#)) calculés entre les segmentations de l'atlas et celles réalisées manuellement sur une souris APP/PS1. Ces critères de superposition ont été calculés après l'estimation de la transformation élastique (scores obtenus **en gras dans le tableau 3.4**). Pour chaque critère et structure, l'écart-type des scores a été calculé afin d'évaluer les différences entre les tests effectués. Seules les différences de volumes hippocampiques et striaux, ainsi que les index de Dice et de sensibilité calculés pour la substance noire ont un écart-type supérieur à 0,05.

La majorité des écarts-types calculés étant inférieure ou égale à 0,05 nous avons admis que les mesures entre les tests effectués étaient peu dispersées. Par conséquent, que l'on considère le volume photographique, histologique ou autoradiographique comme unique modalité de référence, la qualité de la mise en correspondance des images est similaire.

### 3.2.2.2 Recalage de l'IRM pondérée en T1 avec une combinaison de modalités d'imagerie de référence

Les transformations rigides, affines et élastiques ont ensuite été estimées en considérant alternativement les volumes photographiques, histologiques et autoradiographiques. Les mêmes critères de superposition que pour les tests précédents et pour les mêmes structures cérébrales ont été calculés, mais cette fois-ci après chaque étape du recalage. Les scores obtenus ont été reportés dans le [tableau 3.4](#) (résultats non écrits en gras). Pour chaque critère, structure et étape du recalage, l'écart-type des scores obtenus a été calculé.

Après le recalage rigide, les écarts-types calculés pour les différents critères ont tous été inférieurs à 0,05. Nous en avons déduit que le choix de l'image de référence pour cette transformation n'influe pas sur la qualité du recalage de l'IRM sur les données expérimentales. Nous avons décidé de conserver la modalité photographique comme image de référence pour le recalage rigide, modalité spatialement plus cohérente que les deux autres (cf. [paragraphe 2.2.3.1](#) (p. 73)).

Toutes les transformations affines estimées par la suite ont été initialisées avec les paramètres de translation et de rotation obtenus en utilisant le volume photographique comme image de référence pour la première étape de notre stratégie de recalage. Seul l'écart-type calculé entre les index de sensibilité pour la substance noire est supérieur à 0,05 ; les autres écarts-types sont inférieurs à cette valeur. Une fois encore, le choix de l'image de référence pour cette transformation n'a pas semblé influencer sur la qualité du recalage des images. Nous avons donc conservé ici aussi la modalité photographique pour image de référence du recalage.

Enfin, après estimation des transformations élastiques, initialisées avec les paramètres obtenus en ne considérant que la modalité photographique pour image de référence des deux premières étapes du recalage, les scores calculés ont peu varié entre eux, quelle que soit la modalité d'image considérée comme image de référence du recalage.

Ces tests ont montré que combiner des modalités de référence pour recalculer l'IRM pondérée en T1 sur des reconstructions en 3D d'images *post mortem* n'apportait pas d'améliorations majeures et significatives quant à la qualité du recalage des images. Pour les expérimentations décrites dans les sections suivantes, **seul le volume photographique a été considéré comme image de référence** pour les trois transformations estimées.

Ref			Cx		cc		Hc		Striat		SN	
Rig	Aff	Elast	Score	SD								
<b>(a) Différences de volumes</b>												
His			0,02		0,01		0,19		0,06		0,05	
Aut			0,02	<0,01	0,01	<0,01	0,19	<0,01	0,06	<0,01	0,07	0,01
Ph			0,02		0,02		0,19		0,06		0,08	
Ph	His		<0,01		0,03		0,21		0,07		0,06	
Ph	Aut		0,02	0,03	0,01	0,05	0,19	0,04	0,06	0,05	0,06	0,02
Ph	Ph		0,06		0,10		0,27		0,14		0,02	
Ph	Ph	His	<0,01		0,08		0,07		0,19		0,08	
Ph	Ph	Aut	0,04	0,04	0,11	0,02	0,03	0,07	0,16	0,07	0,08	0,04
Ph	Ph	Ph	0,09		0,08		0,15		0,05		0,01	
<b>His</b>	<b>His</b>	<b>His</b>	<b>0,02</b>		<b>0,08</b>		<b>0,04</b>		<b>0,19</b>		<b>0,10</b>	
<b>Aut</b>	<b>Aut</b>	<b>Aut</b>	<b>0,05</b>	<b>0,04</b>	<b>0,09</b>	<b>0,01</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	<b>0,16</b>	<b>0,07</b>	<b>0,11</b>	<b>0,05</b>
<b>Ph</b>	<b>Ph</b>	<b>Ph</b>	<b>0,09</b>		<b>0,08</b>		<b>0,15</b>		<b>0,05</b>		<b>0,01</b>	
<b>(b) Coefficients de Dice</b>												
His			0,79		0,38		0,81		0,78		0,48	
Aut			0,79	<0,01	0,41	0,02	0,83	0,01	0,78	<0,01	0,43	0,04
Ph			0,79		0,41		0,82		0,79		0,50	
Ph	His		0,82		0,50		0,85		0,83		0,59	
Ph	Aut		0,82	0,01	0,48	0,04	0,85	0,02	0,82	0,01	0,60	0,05
Ph	Ph		0,81		0,42		0,82		0,81		0,51	
Ph	Ph	His	0,84		0,56		0,89		0,78		0,66	
Ph	Ph	Aut	0,84	0,01	0,58	0,01	0,90	0,02	0,78	0,02	0,67	0,06
Ph	Ph	Ph	0,85		0,58		0,86		0,81		0,57	
<b>His</b>	<b>His</b>	<b>His</b>	<b>0,84</b>		<b>0,57</b>		<b>0,89</b>		<b>0,79</b>		<b>0,65</b>	
<b>Aut</b>	<b>Aut</b>	<b>Aut</b>	<b>0,84</b>	<b>0,01</b>	<b>0,59</b>	<b>0,01</b>	<b>0,89</b>	<b>0,02</b>	<b>0,79</b>	<b>0,01</b>	<b>0,67</b>	<b>0,06</b>
<b>Ph</b>	<b>Ph</b>	<b>Ph</b>	<b>0,85</b>		<b>0,58</b>		<b>0,86</b>		<b>0,81</b>		<b>0,57</b>	
<b>(c) Index de sensibilité</b>												
His			0,80		0,38		0,74		0,76		0,49	
Aut			0,80	<0,01	0,40	0,02	0,76	0,01	0,76	<0,01	0,45	0,04
Ph			0,80		0,41		0,75		0,77		0,52	
Ph	His		0,82		0,49		0,77		0,80		0,60	
Ph	Aut		0,83	0,03	0,48	0,05	0,78	0,03	0,79	0,02	0,62	0,06
Ph	Ph		0,78		0,40		0,72		0,76		0,50	
Ph	Ph	His	0,84		0,58		0,86		0,86		0,68	
Ph	Ph	Aut	0,85	0,02	0,62	0,03	0,88	0,05	0,85	0,04	0,69	0,07
Ph	Ph	Ph	0,82		0,56		0,80		0,79		0,57	
<b>His</b>	<b>His</b>	<b>His</b>	<b>0,85</b>		<b>0,60</b>		<b>0,87</b>		<b>0,87</b>		<b>0,69</b>	
<b>Aut</b>	<b>Aut</b>	<b>Aut</b>	<b>0,86</b>	<b>0,02</b>	<b>0,62</b>	<b>0,03</b>	<b>0,87</b>	<b>0,04</b>	<b>0,86</b>	<b>0,04</b>	<b>0,70</b>	<b>0,07</b>
<b>Ph</b>	<b>Ph</b>	<b>Ph</b>	<b>0,82</b>		<b>0,56</b>		<b>0,80</b>		<b>0,79</b>		<b>0,57</b>	

Tableau 3.4 – Comparaison quantitative des différents recalages selon l'image de référence choisie par calcul de la différence de volumes, du coefficient de Dice et de l'index de sensibilité pour le cortex cérébral (Cx), le corps calleux (cc), l'hippocampe (Hc), le striatum (Striat) et la substance noire (SN) d'une souris APP/PS1. Les volumes histologique (His), autoradiographique (Aut) et photographique (Ph) ont été successivement considérés comme image de référence pour chaque étape de la stratégie de recalage (rigide (Rig), affine (Aff) et élastique (Elast)). Les scores obtenus pour les tests ne considérant qu'une unique modalité référente pour l'ensemble des transformations sont indiqués en gras. Les écarts-types des résultats obtenus par test (SD) indiquent que le choix de l'image de référence pour un recalage n'a pas influé sur sa qualité (globalement  $SD \leq 0,05$ ). Pour chaque étape de recalage, nous avons conservé la photographie comme modalité de référence.

### 3.2.3 Discussion sur la stratégie de recalage mise en place

Cette étude de faisabilité a été réalisée pour évaluer qualitativement et quantitativement s'il était possible de recaler une IRM de cerveau entier de souris acquise *in situ* sur des reconstructions 3D d'images de demi-cerveaux acquises *post mortem* et *ex situ* et ce, en vue d'analyser les images anatomiques et fonctionnelles *post mortem*.

La stratégie de recalage proposée a consisté à **augmenter progressivement le nombre de degrés de liberté** des transformations géométriques pour recaler une IRM sur nos images 3D expérimentales. Cette approche a permis d'affiner au fur et à mesure le recalage de ces images dont les champs de vue, les géométries et les localisations globales des objets à apparier (demi-cerveaux) étaient initialement différents.

#### 3.2.3.1 Evaluation de la qualité du recalage

Recaler des images multimodales puis évaluer l'opération n'est pas chose aisée étant donné que les informations contenues dans une image ne se retrouvent pas forcément dans l'autre image. Superposer les images pour évaluer localement la mise en correspondance de chacune des données ou calculer des critères de superposition pour valider la concordance des segmentations réalisées pour l'une et l'autre images est un exercice difficile.

Notre étude a été d'autant plus complexe qu'en plus de la difficulté de la multimodalité, nous avons cherché à mettre en correspondance une image de cerveau de souris dans sa géométrie d'origine, post-traitée semi-automatiquement (zone de l'IRM à apparier, voir [paragraphe 3.1.1 \(p. 79\)](#)) avec des images de demi-cerveaux de souris déformés physiquement par le protocole d'acquisition des images (cf. [paragraphe 1.2.1 \(p. 9\)](#)). En plus des déformations des coupes numérisées dues à la manipulation des tissus, ces images *post mortem ex situ* sont par essence dépourvues de méninges<sup>e</sup> et de liquide céphalo-rachidien, alors que ces membranes et liquide sont présents sur l'IRM (image acquise en conservant le cerveau dans la boîte crânienne). Par conséquent, certaines structures, comme les ventricules, cavités cérébrales participant à la circulation de fluide, ne peuvent apparaître de façon identique dans les deux images. Le recalage de structures avoisinantes, telles que l'hippocampe ou le corps calleux (voir [figure 3.6 \(p. 88\)](#)), peut donc être impacté par ces déformations. Ceci peut expliquer les scores obtenus pour les critères de superposition de l'hippocampe et du corps calleux (cf. [tableau 3.2 \(p. 93\)](#)).

---

e. Les méninges sont les membranes enveloppant le système nerveux central, la portion intra-crânienne des nerfs crâniens et les racines des nerfs spinaux.

Une autre hypothèse peut être proposée pour expliquer l'obtention de ces résultats. Les différences entre les segmentations de l'atlas et celles réalisées manuellement ont pu être dues à la définition même des structures, fait survenant lorsque des segmentations réalisées par deux méthodes différentes sont comparées. En effet, bien que des compromis et post-traitements aient été faits pour rendre comparables le plus possible les segmentations (cf. [paragraphe 3.1.3.2 \(p. 87\)](#)), il est peu probable d'avoir atteint l'adéquation parfaite entre les deux tracés. Ces différences persistantes sont particulièrement visibles au niveau des fines structures telles que le corps calleux ou encore des structures de forme complexe telles que l'hippocampe (cf. [paragraphe 3.1.3.2 \(p. 87\)](#)). La stratégie de recalage proposée a été principalement dirigée par les grosses structures et celles ayant une géométrie simple, aux dépens de celles plus petites en taille et/ou ayant une géométrie plus complexe. La contribution des diverses structures a donc été différente sur le recalage global. Certains paramètres de recalage, tels que ceux jouant sur les facteurs d'échelle, ont pu amplifier les différences pour ces petites structures de forme plus ou moins complexe. Pour améliorer le recalage de ces petites structures, une approche itérative pourrait être adoptée. Une première étape pourrait consister à recalibrer l'ensemble des structures de l'atlas en utilisant l'approche proposée dans ce chapitre. Une seconde étape consisterait alors à estimer localement des transformations permettant d'optimiser le recalage des structures les moins bien recalées tout en contraignant le déplacement des structures avoisinantes jugées correctement recalées. Les transformations estimées pourraient être de nature multi-affines comme celles proposées dans l'étude [Commowick et al. \(2008\)](#).

La superposition des contours de l'IRM sur les images histologiques (cf. [figure 3.7 \(p. 92\)](#)), ainsi que la superposition des segmentations de l'hippocampe, définies par l'atlas et manuellement (cf. [figure 3.8 \(p. 95\)](#)), montrent bien que **la stratégie de recalage proposée est parvenue à déformer progressivement l'IRM et l'atlas associé pour qu'ils puissent être recalés correctement sur les données expérimentales**. Les déformations de la grille en [figure 3.7\(e\)](#) attestent que la transformation non-affine n'a pas déformé de façon excessive les structures internes, mais plutôt celles situées en périphérie du cerveau. Considérant également les scores élevés obtenus pour les critères de superposition après l'estimation de la transformation affine (voir [tableau 3.2 \(p. 93\)](#)), nous avons conclu que cette transformation était proche de la solution et par conséquent initialisait bien la transformation élastique. L'algorithme de la *Free Form Deformation* a optimisé, de façon efficace, le recalage en se basant sur une grille dense de points de contrôle ; une approche multi-échelles sur cet algorithme ne nous est pas apparue nécessaire.

Les scores finaux obtenus pour chaque critère de superposition calculé sont élevés : les index moyen de Dice et de sensibilité valent respectivement  $\sim 0,72$  et  $\sim 0,68$  (cf. [tableau 3.2](#)). Ils attestent que **l'atlas a été capable de classifier correctement, les pixels des volumes expérimentaux dans les structures cérébrales adéquates**. La [figure 3.8](#) montre par ailleurs que les erreurs de mesure des volumes des structures telles que l'hippocampe ont été distribuées de façon homogène. La forme générale et la localisation des

structures étant préservées, nous avons conclu que cet atlas pouvait être utilisé pour segmenter automatiquement les régions anatomiques présentes dans une reconstruction 3D d'images *post mortem*. Cette conclusion a été renforcée par les coefficients de variation de mesure d'activité moyenne au sein d'une structure, montrés dans le [tableau 3.3 \(p. 96\)](#). Globalement, les activités mesurées par les segmentations de l'atlas et celles délimitées manuellement ont peu différencié entre elles ( $\delta_\mu \leq 5\%$ ). **Une analyse fonctionnelle des images de la base de données a donc pu être menée avec cet atlas.**

### 3.2.3.2 Choix de la modalité de référence pour le recalage

La stratégie de recalage a été définie en trois étapes : estimations de transformations rigides, affines et élastiques. Ayant à notre disposition des volumes histologiques, autordiagraphiques et photographiques pour chaque sujet de la base, nous avons déterminé, en nous appuyant sur les critères de superposition, quelle était la modalité à considérer comme image de référence pour chaque étape du recalage. A notre connaissance, cette étude n'a jamais été réalisée. Les tests ont montré que **le choix de telle ou telle modalité n'apportait pas d'améliorations majeures et significatives à la qualité du recalage des images** (voir les résultats du [tableau 3.4 \(p. 99\)](#)). L'analyse de nos données expérimentales a donc été réalisée en considérant **uniquement le volume photographique comme image de référence** pour les trois transformations estimées.

## 3.3 Sélection de l’atlas numérique 3D pour analyser les données expérimentales

Les recherches bibliographiques présentées dans le [paragraphe 1.5.3](#) (p. 52) nous ont permis d’avoir accès à deux atlas de cerveaux de souris créés par des équipes différentes (voir [section 2.1](#) (p. 64)). Une approche d’analyse par atlas d’images *post mortem* reconstruites en 3D a été développée et validée avec l’atlas mis à disposition par le CIVM. Nous avons ensuite évalué si la méthode utilisée pour créer l’atlas pouvait influencer sur nos analyses ultérieures, et le cas échéant, avons déterminé quel atlas (celui du LONI ou celui du CIVM) était le plus à même d’être utilisé pour analyser la base de données de l’étude.

### 3.3.1 Protocole de comparaison des atlas

#### 3.3.1.1 Homogénéisation de la définition des structures des atlas

Les atlas originaux fournis par les deux laboratoires comportent tous deux une trentaine de structures (voir [annexes B](#) (p. 178) et [C](#) (p. 181)). Beaucoup de structures présentes dans un atlas ne le sont pas dans l’autre, ou du moins pas exactement : les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> ventricules sont par exemple différenciés dans l’atlas du LONI mais pas dans celui du CIVM et la structure dénommée *amygdale*, proche du cortex, a été segmentée dans l’atlas du CIVM mais pas dans celui du LONI. Pour être en mesure de comparer les analyses de nos données, il a fallu dans un premier temps homogénéiser la définition des structures dans les deux modèles numériques.

Les segmentations des atlas ont ainsi été harmonisées afin d’obtenir des structures anatomiques cohérentes entre les deux atlas. La liste de ces **quinze nouvelles structures** ainsi que le détail des agglomérats réalisés sont détaillés en [annexe D](#) (p. 184). Les volumes de ces structures sur un hémisphère sont présentés dans le [tableau 3.5](#). Nous observons que malgré les modifications apportées, certaines structures, comme le cortex cérébral, n’ont pas le même volume dans les deux atlas. La [figure 3.9](#) illustre cette nouvelle organisation.

Structures	Volume (en mm <sup>3</sup> )	
	Segmentation définie dans l'atlas du CIVM	Segmentation définie dans l'atlas du LONI
Commissure antérieure	0,36	0,44
Tronc cérébral	26,14	21,83
Cervelet	4,06	2,34
Cortex cérébral	91,03	51,10
Corps calleux	6,47	4,75
Fimbria	1,98	2,07
Hippocampe	12,48	8,84
Hypothalamus	4,81	4,89
Capsule interne	1,28	2,02
Tractus optique	0,57	0,33
Striatum	16,18	12,97
Thalamus	15,72	7,89
Ventricules	2,56	0,52
Bulbe olfactif	7,20	5,91
Substance noire	0,89	0,63

Tableau 3.5 – Volumes (en mm<sup>3</sup>) des structures définies dans un des hémisphères des atlas du CIVM et du LONI, après homogénéisation des segmentations.

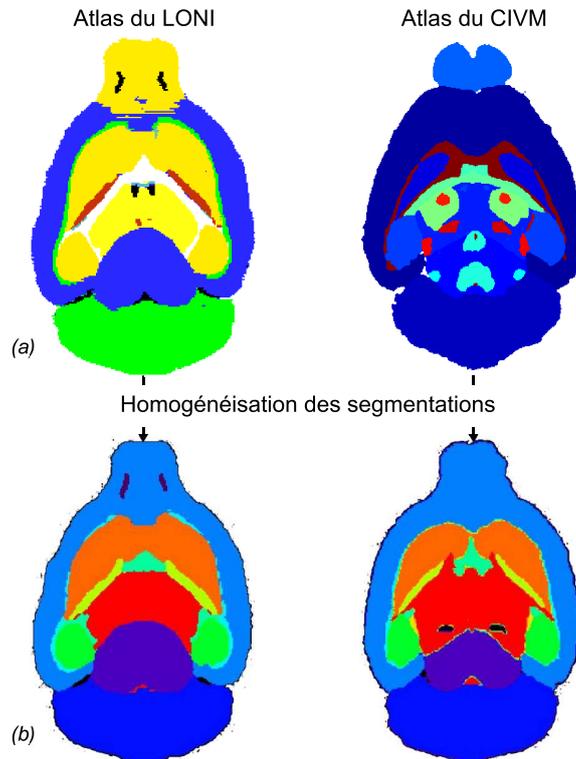


Figure 3.9 – (a) Atlas originaux créés par le LONI (à gauche) et le CIVM (à droite). (b) Atlas du LONI et du CIVM après homogénéisation des segmentations (voir annexe D).

### 3.3.1.2 Comparaison des segmentations des atlas

Pour comparer spatialement les segmentations des atlas, un des modèles numériques a été recalé sur l'autre en utilisant la stratégie de recalage proposée auparavant. Les critères de superposition ont ensuite été calculés entre les segmentations des atlas. Le [tableau 3.6](#) présente les scores obtenus pour ces critères. Globalement, nous n'avons pas obtenu de scores optimaux pour les petites structures (cf. [tableau 3.5](#)), notamment pour le corps calleux et la substance noire. Cela peut être en partie être dû à des erreurs de recalage, à des différences persistantes entre les segmentations de chacun des atlas ou bien à la variabilité entre les souris ayant servies à créer les atlas.

Structures segmentées	Différences de volumes	Coefficients de Dice	Index de sensibilité
Commissure antérieure	0,57	0,31	0,43
Tronc cérébral	0,07	0,87	0,84
Cervelet	0,07	0,92	0,89
Cortex cérébral	0,11	0,87	0,82
Corps calleux	0,35	0,50	0,61
Fimbria	0,56	0,55	0,76
Hippocampe	0,10	0,82	0,87
Hypothalamus	0,44	0,71	0,90
Capsule interne	0,82	0,44	0,74
Tractus optique	0,28	0,30	0,29
Striatum	0,26	0,78	0,89
Thalamus	0,24	0,77	0,69
Ventricules	0,75	0,32	0,24
Bulbe olfactif	0,01	0,78	0,78
Substance noire	0,09	0,58	0,55

*Tableau 3.6 – Critères de superposition (Différences de volumes, Coefficient de Dice et Index de sensibilité) calculés entre les segmentations des atlas du LONI et du CIVM une fois ces volumes mis en correspondance par la méthode proposée en [section 3.1](#).*

### 3.3.2 Choix de l'atlas pour analyser les données de l'étude

Nous avons considéré que les modifications apportées aux structures définies dans les atlas ont fourni des modèles numériques de cerveaux de souris suffisamment cohérents entre eux d'un point de vue de la segmentation pour effectuer les tests suivants.

Pour déterminer lequel de ces deux atlas était le plus adapté pour analyser les données, les atlas du LONI et celui du CIVM ont été successivement recalés sur les volumes photographiques de la souris PS1 et de la souris APP/PS1 dont cinq structures anatomiques ont été segmentées pour l'étude de faisabilité de la méthode de recalage (voir section 3.2 (p. 91)). La mise en correspondance de ces données a été effectuée selon la stratégie proposée précédemment (voir section 3.1 (p. 79)).

#### 3.3.2.1 Comparaison qualitative des recalages de ces deux atlas sur nos données

Pour comparer qualitativement la mise en correspondance de chaque atlas sur nos données, nous avons superposé les segmentations des atlas recalés sur celles délimitées manuellement. La figure 3.10 montre qu'après recalage sur les données de l'étude, la segmentation du striatum définie dans l'atlas du CIVM est mieux superposée sur la segmentation manuelle que celle provenant de l'atlas du LONI. Nous avons pu faire cette même observation sur l'ensemble des structures segmentées sur la souris PS1 et la souris APP/PS1 : **une meilleure adéquation entre les segmentations de référence et les segmentations de l'atlas du CIVM comparativement à celles de l'atlas du LONI.**

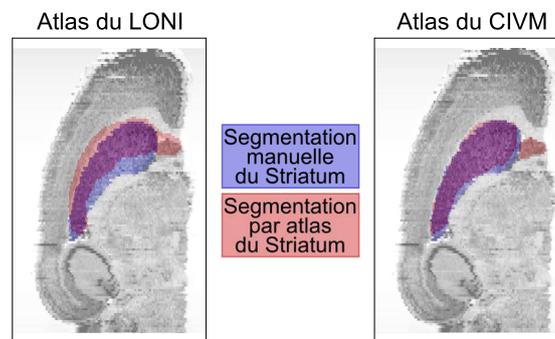


Figure 3.10 – Superposition des segmentations du striatum par l'atlas du LONI (à gauche) et du CIVM (à droite) (en rouge) sur la segmentation manuelle de cette structure (en bleue) réalisée sur un volume histologique d'une souris PS1, une fois chaque atlas recalé sur les données de cette souris. La segmentation fournie par l'atlas du CIVM est mieux superposée à la segmentation de référence que celle fournie par l'atlas du LONI.

### 3.3.2.2 Comparaison quantitative du recalage des deux atlas sur les données de l'étude

Les critères de superposition ont ensuite été calculés pour comparer la concordance des segmentations provenant des atlas avec celles réalisées manuellement<sup>f</sup>. Les scores obtenus pour la souris PS1 et la souris APP/PS1 segmentées sont montrés dans le [tableau 3.7](#).

	Segmentations de l'atlas du CIVM			Segmentations de l'atlas du LONI		
	$\Delta_V$	$\kappa$	Se	$\Delta_V$	$\kappa$	Se
<b>(a) Souris PS1 (ctrl)</b>						
Cortex	0,04	0,82	0,84	0,11	0,80	0,76
Corps calleux	0,29	0,54	0,47	0,03	0,46	0,46
Hippocampe	0,18	0,83	0,76	0,05	0,85	0,83
Striatum	0,08	0,81	0,84	0,24	0,68	0,77
Substance noire	0,26	0,47	0,41	0,25	0,64	0,57
<b>(b) Souris APP/PS1 (modèle MA)</b>						
Cortex	<0,01	0,84	0,83	0,16	0,79	0,73
Corps calleux	0,08	0,58	0,56	0,14	0,38	0,41
Hippocampe	0,15	0,86	0,80	<0,01	0,86	0,86
Striatum	0,15	0,78	0,84	0,40	0,68	0,85
Substance noire	0,01	0,57	0,57	0,03	0,51	0,52

Tableau 3.7 – Critères de superposition (Différences de volumes ( $\Delta_V$ ), Coefficients de Dice ( $\kappa$ ) et Index de sensibilité (Se)) calculés entre les segmentations manuelles de cinq structures (cortex cérébral, corps calleux, hippocampe, striatum et substance noire) délimitées sur une souris PS1 et une souris APP/PS1, et les segmentations définies par les atlas du CIVM et du LONI une fois ces derniers recalés sur les images des souris PS1 et APP/PS1. En moyenne, sur l'ensemble des structures segmentées, les segmentations de l'atlas du CIVM se superposent mieux que celles de l'atlas du LONI sur les segmentations manuelles :  $\bar{\kappa}(CIVM) \simeq 0,71$  contre  $\bar{\kappa}(LONI) \simeq 0,66$  et  $\bar{Se}(CIVM) \simeq 0,69$  contre  $\bar{Se}(LONI) \simeq 0,67$ .

Le [tableau 3.7](#) indique que l'atlas du CIVM a mesuré le volume :

- du cortex cérébral avec une erreur moyenne de 3 % contre 14 % pour l'atlas du LONI ;
- du corps calleux avec une erreur moyenne de 19 % contre 9 % pour l'atlas du LONI ;
- de l'hippocampe avec une erreur moyenne de 17 % contre 3 % pour l'atlas du LONI ;
- du striatum avec une erreur moyenne de 12 % contre 32 % pour l'atlas du LONI ;
- de la substance noire avec une erreur moyenne de 14 % comme pour l'atlas du LONI.

f. Les scores obtenus pour les segmentations de l'atlas du CIVM sont sensiblement différents de ceux obtenus en [paragraphe 3.2.1.2 \(p. 93\)](#) du fait des traitements apportés aux segmentations de l'atlas pour les homogénéiser avec celles de l'atlas du LONI.

Ce critère ne permet pas de déterminer le modèle numérique le plus approprié pour analyser les données de la base. En revanche, les index finaux de Dice et de sensibilité obtenus avec les segmentations de l'atlas du CIVM sont respectivement  $\sim 0,71$  et  $\sim 0,69$  en moyenne contre  $\sim 0,66$  et  $\sim 0,67$  pour l'atlas du LONI. Ces résultats ont confirmé les observations faites précédemment, à savoir que les segmentations de l'atlas du CIVM se superposaient mieux que celles provenant de l'atlas du LONI sur les segmentations manuelles.

Au vu de l'ensemble de ces observations et résultats quantitatifs, **nous avons considéré l'atlas proposé par le CIVM pour mener les analyses anatomo-fonctionnelles**. Les segmentations de cet atlas comme décrit en [annexe C \(p. 181\)](#) ont été conservées pour la suite de l'étude.

## 3.4 Analyse par atlas de volumes *post mortem* anatomiques et fonctionnels

L'analyse des données de l'étude avec l'atlas a permis de :

1. évaluer la robustesse de l'approche d'analyse des données *post mortem* 3D par l'atlas du CIVM ;
2. quantifier les différences morphologiques et fonctionnelles entre les deux groupes de souris (souris contrôles (PS1) versus souris modélisant la maladie d'Alzheimer (APP/PS1)).

### 3.4.1 Recalage de l'atlas sur les données de l'étude

Pour mener l'analyse des volumes *post mortem* anatomiques et fonctionnels de la base de données (trois souris PS1 et quatre souris APP/PS1), nous avons recalé l'atlas du CIVM selon la stratégie proposée (cf. section 3.1 (p. 79)). Nous avons vérifié visuellement que les contours de l'IRM pondérée en T1 se superposaient bien avec chacun des volumes histologiques.

### 3.4.2 Étude de groupe à l'échelle des structures cérébrales

Après recalage de l'atlas sur chaque souris de la base, les volumes de plusieurs structures définies par les segmentations de l'atlas ainsi que les activités contenues dans chaque segmentation ont été calculés. Pour cela, les images anatomiques (volumes photographiques ou histologiques) et fonctionnelles (volumes autoradiographiques<sup>g</sup>) propres à chaque animal ont été respectivement utilisées. Le volume moyen ( $\bar{V} \pm SEM$ ) et l'activité moyenne ( $\overline{\mu_{act}} \pm SEM$ ) pondérés par l'erreur type de la moyenne (SEM pour *Standard Error Mean* en anglais) ont ensuite été calculés pour chaque région anatomique étudiée et pour chaque groupe de souris (PS1 versus APP/PS1). Un test de Student bilatéral non-apparié a été effectué pour évaluer la significativité des différences trouvées entre les deux groupes (seuil de significativité fixé à 5%).

En plus des structures précédemment citées, *i.e.* le cortex cérébral, le corps calleux, l'hippocampe, le striatum et la substance noire, les volumes et activités des colliculi inférieur et supérieur (structures paires non sous-corticales, situées dans la partie postérieure du cerveau), du thalamus (structure impaire, située dans la partie centrale du cerveau), ainsi que de l'hémisphère dans son intégralité ont été calculés.

---

g. Les volumes autoradiographiques ont été normalisés en intensité selon la note de la fin du chapitre 2 (p. 76)

Les résultats des volumes et activités moyens par structure et par groupe sont présentés dans le [tableau 3.8](#). Nous avons observé que pour les très grandes structures (hémisphère et cortex cérébral), l'atlas était capable de mesurer de façon robuste les volumes et les activités (SEM par structure et par groupe faible au regard de la moyenne). Les segmentations définies par l'atlas ont également fourni des mesures volumiques et fonctionnelles du même ordre de grandeur pour les structures sous-corticales (corps calleux, hippocampe, striatum et thalamus). Pour les structures non sous-corticales (colliculi inférieurs et supérieurs) ainsi que pour les très petites structures profondes (substance noire), les mesures volumétriques ont été plus dispersées : pour les colliculi inférieurs (IC) et supérieurs (SC) des souris PS1, nous avons  $\bar{V}(IC_{PS1}) = 2,48 \pm 0,15 \text{ mm}^3$ ,  $\bar{V}(SC_{PS1}) = 6,12 \pm 0,42 \text{ mm}^3$ . Il en a été de même pour les mesures d'activités de ces structures : pour les colliculi inférieurs des souris PS1 et APP/PS1, nous avons  $\overline{\mu_{act}}(IC_{PS1}) = 233,11 \pm 16,55 \text{ nCi/g}$  et  $\overline{\mu_{act}}(IC_{APP/PS1}) = 295,80 \pm 26,98 \text{ nCi/g}$ , et pour les substances noires (SN), nous avons mesuré  $\overline{\mu_{act}}(SN_{PS1}) = 177,08 \pm 20,98 \text{ nCi/g}$ .

Les tests de Student effectués n'ont pas révélé, à l'échelle des segmentations de l'atlas, de différences significatives volumétriques ou fonctionnelles entre ces groupes ( $p \geq 0,05$ ).

	Souris PS1 (n = 3)	Souris APP/PS1 (n = 4)
<b>(a) Volume moyen des structures <math>\bar{V} \pm SEM</math> (mm<sup>3</sup>)</b>		
Hémisphère	176,77 ± 8,19	175,57 ± 1,96
Cortex cérébral	75,64 ± 4,21	75,28 ± 0,65
Corps calleux	5,84 ± 0,24	5,98 ± 0,03
Hippocampe	11,89 ± 0,32	12,90 ± 0,24
Colliculus inférieur	2,48 ± 0,15	2,49 ± 0,12
Colliculus supérieur	6,12 ± 0,42	5,55 ± 0,05
Striatum	12,53 ± 0,16	12,58 ± 0,25
Substance noire	0,75 ± 0,02	0,79 ± 0,04
Thalamus	17,27 ± 0,76	16,49 ± 0,75
<b>(b) Activité moyenne par structure <math>\overline{\mu_{act}} \pm SEM</math> (nCi/g)</b>		
Hémisphère	216,04 ± 3,12	222,51 ± 1,72
Cortex cérébral	270,54 ± 2,68	272,68 ± 2,39
Corps calleux	211,45 ± 7,87	215,00 ± 3,17
Hippocampe	237,67 ± 1,08	228,24 ± 3,39
Colliculus inférieur	233,11 ± 16,55	295,80 ± 26,98
Colliculus supérieur	252,78 ± 6,97	258,68 ± 6,51
Striatum	284,04 ± 5,55	274,3 ± 0,87
Substance noire	177,08 ± 20,98	188,22 ± 9,02
Thalamus	263,76 ± 5,42	242,96 ± 1,78

Tableau 3.8 – Volume moyen ( $\bar{V} \pm SEM$ ) et activité moyenne ( $\overline{\mu_{act}} \pm SEM$ ) mesurés par les segmentations définies dans l’atlas, une fois celui-ci recalé sur les images de la base de données de notre étude. “SEM” représente l’erreur type de la moyenne (acronyme de l’expression anglophone *Standard Error Mean*). Les mesures volumétriques et fonctionnelles par l’atlas des grandes structures (hémisphère, cortex cérébral) et/ou sous-corticales (corps calleux, hippocampe, striatum et thalamus) sont homogènes au sein d’un groupe de souris ; les mesures réalisées pour les plus petites structures profondes et/ou non sous-corticales (substance noire, colliculi inférieur et supérieur) sont elles plus dispersées. A l’échelle des segmentations de l’atlas, les différences volumétriques et fonctionnelles entre les groupes n’ont pas été statistiquement significatives ( $p \geq 0,05$ ).

### 3.4.3 Discussion des résultats obtenus

#### 3.4.3.1 Confrontation des résultats avec ceux de la littérature

Les résultats présentés dans le [tableau 3.8](#) ont montré que les mesures réalisées avec les segmentations de l'atlas, recalé sur chaque sujet de la base, étaient globalement homogènes au sein d'un même groupe de souris (exemple du volume de l'hippocampe (HC) sur un hémisphère :  $\bar{V}(H_{C_{APP/PS1}}) = 12,9 \pm 0,24 \text{ mm}^3$ ). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans des études similaires comme celle décrite dans [Maheswaran et al. \(2009b\)](#), étude menée sur des acquisitions IRM de cerveaux entiers de souris d'une lignée différente analysées par l'atlas fourni par le LONI ( $\bar{V}(H_{CTASTPM}) = 25,4 \pm 0,75 \text{ mm}^3$ ). Ceci montre que l'approche d'analyse par atlas permet d'analyser avec une robustesse équivalente des images de cerveaux de souris aussi bien obtenues par IRM qu'obtenues par des techniques d'imagerie *post mortem*.

Les travaux décrits dans [Delatour et al. \(2006\)](#) présentent des résultats morphométriques obtenus sur les mêmes lignées transgéniques que celles de notre base de données. Ces derniers diffèrent un peu de ceux que nous avons présenté dans le [tableau 3.8](#). L'écart entre les résultats peut être dû aux différentes méthodes utilisées. En effet, alors que nous avons analysé des images *post mortem* 3D en utilisant les segmentations d'un atlas, l'équipe de Delatour a estimé les volumes des structures anatomiques en se basant sur des segmentations manuelles réalisées sur des coupes épaisses de  $40\mu\text{m}$  (1 coupe sur 8 a été segmentée). Les volumes ont ensuite été déterminés en utilisant la méthode de Cavalieri.

Notre analyse de groupe n'a pas mis en évidence de différences volumétriques et/ou fonctionnelles statistiquement significatives à l'échelle des régions anatomiques. Des conclusions similaires ont été tirées à l'occasion d'autres études analysant cette fois-ci des images de cerveaux entiers ([Sadowski et al., 2004](#); [Delatour et al., 2006](#)). La concordance de nos résultats avec ces études montre que malgré les déformations supplémentaires induites par notre protocole d'acquisition des images (les cerveaux ont été coupés en deux), notre méthode a fourni des résultats du même ordre de grandeur et avec la même robustesse que ceux obtenus avec des méthodes standards (segmentations manuelles).

### 3.4.3.2 Limitation de l'approche d'analyse par atlas

Certaines mesures réalisées par les segmentations de l'atlas sont plus dispersées au sein d'un même groupe de souris (exemples des mesures réalisées pour les colliculi inférieurs (IC) et pour les substances noires (SN) :  $\overline{\mu_{act}}(IC_{APP/PS1}) = 295,80 \pm 26,98$  nCi/g,  $\overline{\mu_{act}}(SN_{PS1}) = 177,08 \pm 20,98$  nCi/g). Ces résultats peuvent être liés à la taille et la localisation de la structure étudiée. En effet, le colliculus inférieur est une structure non sous-corticale et proche du cervelet. La substance noire est aussi une structure non sous-corticale, profonde et située sous le thalamus. Plus exposées que les structures sous-corticales et centrales, ces régions ont pu être déformées au moment de l'extraction et de la coupe du cerveau. Par ailleurs, comme nous l'avons mentionné dans le [paragraphe 3.2.3.1 \(p. 100\)](#), les petites structures (comme le colliculus inférieur,  $\overline{V}(IC) \sim 2,49, \text{mm}^3$  et la substance noire,  $\overline{V}(SN) \sim 0,77 \text{mm}^3$ ) ont pu pâtir de petites erreurs de recalage provenant d'une structure adjacente plus importante (le colliculus supérieur ou plus vraisemblablement le cortex cérébral pour l'exemple du colliculus inférieur, et le thalamus pour ce qui concerne la substance noire). Alors que l'erreur de recalage sur les régions de grande taille a été jugé négligeable, les conséquences ont pu être plus importantes sur les petites structures avoisinantes. Ceci a pu entraîner une contamination de l'activité mesurée par les structures avoisinantes. Ces résultats montrent une limitation sur les petites structures de l'approche d'analyse d'images autoradiographiques par atlas.

Nous avons noté par ailleurs que l'équipe de Sadowski a obtenu des différences statistiquement significatives entre ses groupes de souris pour certaines sous-structures de l'hippocampe (cf. [Sadowski et al. \(2004\)](#)). Cette observation suggère bien que l'approche d'analyse de volumes par atlas est dépendante de l'échelle de segmentation des structures définies dans l'atlas en question.

### 3.5 Bilan de l'approche d'analyse par atlas des images *post mortem* 3D et valorisation des travaux

L'étude bibliographique décrite en [section 1.3 \(p. 23\)](#) ainsi que les différents tests effectués ont permis d'évaluer, grâce à des critères d'évaluation visuelle et quantitative, l'application successive des transformations mathématiques estimées pour mettre en correspondance les segmentations définies dans un atlas numérique avec les données de l'étude. Nos travaux ont mis en évidence les difficultés de recalibrer une image acquise *in situ* (volume IRM à l'origine de l'atlas numérique) sur des images acquises *ex situ* (données expérimentales du projet). Les critères d'évaluation de notre méthode ont montré qu'un tel atlas pouvait être utilisé, à l'échelle de ses segmentations, pour analyser des volumes d'images anatomiques et fonctionnelles acquises *ex situ* et ce aussi bien qu'un expert en neuroanatomie mais en beaucoup moins de temps et en évitant tout biais inhérent à l'opérateur.

Les résultats de nos expériences ont attesté que l'atlas développé par le laboratoire du CIVM était plus adapté que celui créé par le laboratoire du LONI pour analyser les données de l'étude. Cette stratégie de recalage d'images multimodales ainsi que les validations qualitatives et quantitatives ont été valorisées lors de **conférences internationales**, sous forme de poster lors de la conférence 2009 de l'International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) ([Lebenberg et al., 2009a](#)) et à travers une **communication orale** lors de l'IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI) 2009 ([Lebenberg et al., 2009b](#)), et enfin dans un article scientifique publié dans la revue **NeuroImage** ([Lebenberg et al., 2010a](#)).

Le recalage de l'atlas numérique sélectionné sur les volumes anatomiques (photographiques ou histologiques) et fonctionnels (autoradiographiques) nous a permis de mesurer les volumes et les activités des structures cérébrales segmentées par l'atlas. Nous avons ainsi pu obtenir des moyennes volumétriques et fonctionnelles pour chacun des deux groupes de souris de l'étude et comparer les résultats entre ces groupes. Les résultats obtenus sont homogènes intra-groupe et cohérents avec ceux de la littérature. Ces résultats n'ont pas révélé de différences significatives entre les deux lignées à l'échelle de la structure cérébrale. Dans une étude menée en parallèle de ce projet de thèse et présentée dans [Dubois et al. \(2010b\)](#), des différences métaboliques entre les deux groupes de souris transgéniques ont été mises en évidence en utilisant une approche par comparaison statistique des pixels des images autoradiographiques. Ces différences fonctionnelles ont cependant dû être identifiées manuellement. Ces résultats montrent que les approches d'analyse à l'échelle de la structure cérébrale définie par un atlas numérique et celle réalisée à l'échelle du pixel ont toutes deux des limitations différentes. Il nous a semblé intéressant de voir s'il était possible de combiner ces deux approches d'analyse afin de bénéficier de leurs avantages respectifs et ainsi améliorer la technique d'analyse globale.

Nous avons proposé dans ce chapitre une stratégie pour recalrer un atlas numérique 3D sur des volumes de données post mortem afin d'analyser par atlas de telles données expérimentales. Cette stratégie a consisté à recalrer, en estimant des transformations affines et non affines, une IRM, utilisée pour déterminer les segmentations d'un atlas, sur un volume photographique créé pour chaque sujet de la base à étudier. Les paramètres de déformation ont ensuite été appliqués à l'atlas 3D. Ainsi, toutes les segmentations de l'atlas ont pu être appliquées sur les volumes anatomiques et fonctionnels acquis pour chaque sujet de la base (voir figure 3.11). Cette approche d'analyse par atlas a permis de fournir rapidement des résultats reproductibles et cohérents avec ceux de la littérature. Cette méthode souffre néanmoins de quelques limitations propres à la stratégie de recalage et à l'échelle d'analyse des données. Nos recherches bibliographiques ont montré qu'une analyse par comparaison statistique des intensités des images permettait d'obtenir des résultats pertinents pour ce type d'étude. Présentant des limitations différentes, nous avons proposé dans le chapitre qui suit de combiner ces deux approches d'analyse afin de bénéficier des avantages de chacune et ainsi améliorer la technique d'analyse.

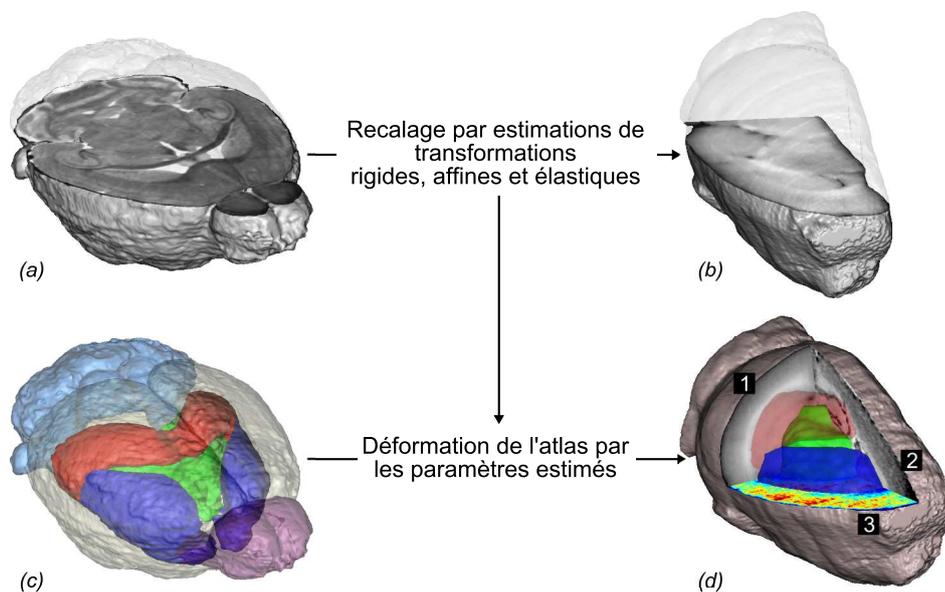
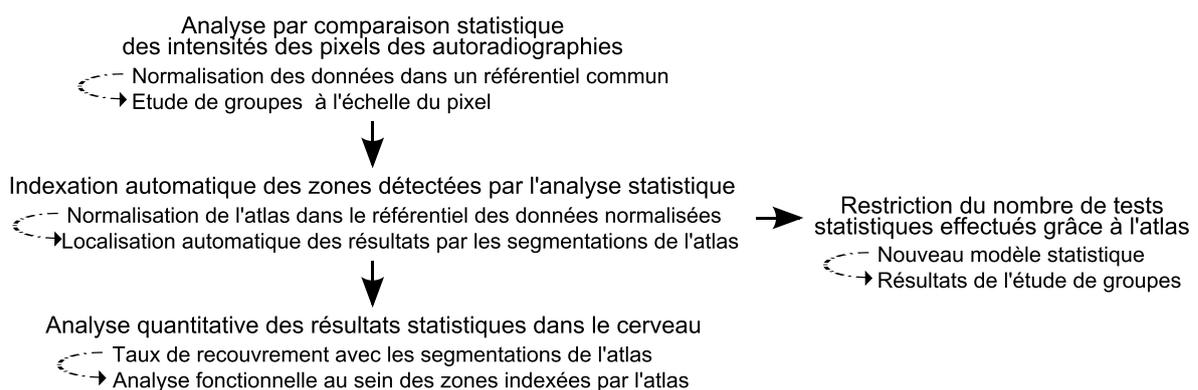


Figure 3.11 – Stratégie de recalage proposée pour analyser par atlas des images post mortem anatomiques et fonctionnelles reconstruites en 3D. L'IRM (a) utilisée pour déterminer les segmentations de l'atlas (c) a été recalée par estimation de transformations rigides, affines et élastiques sur un volume photographique (b) créé pour chaque sujet étudié. L'atlas (c) a ensuite été déformé par les paramètres précédemment estimés. Les segmentations peuvent ainsi se superposer (d) à tous les volumes anatomiques (photographique [1], histologique [2]) et fonctionnel (autoradiographique [3]) d'un sujet étudié. Des informations volumiques et fonctionnelles peuvent ainsi être extraites à l'échelle des structures définies par l'atlas.

# Chapitre 4

## Supervision par atlas de l'analyse statistique des intensités des pixels

*Dans ce chapitre nous décrivons la stratégie d'analyse de volumes post mortem combinant les approches par comparaison statistique des intensités des pixels des images, (voir paragraphe 1.5.2) et celle par atlas, développée dans le chapitre précédent. Nous avons montré comment cette combinaison de méthodes a permis de tirer profit des avantages offerts par ces deux approches d'analyse, à savoir la détection de différences métaboliques locales et leur localisation dans le cerveau. Les résultats obtenus uniquement par analyse sans a priori sont tout d'abord présentés et discutés. La méthode de supervision d'une telle analyse par un atlas numérique est détaillée par la suite. Une fois les résultats d'indexation des zones de variations métaboliques entre les deux lignées de souris discutés, nous avons réalisé une analyse quantitative des résultats précédemment obtenus. Nous avons enfin exploré la possibilité d'améliorer la significativité des comparaisons statistiques grâce à l'utilisation des segmentations de l'atlas. Un bilan sur les apports d'une telle combinaison de méthodes d'analyse clôt ce chapitre. La figure 4.1 présente une vue synthétique de l'organisation de ce chapitre ainsi que des principaux points abordés.*



Apports de la combinaison des approches par atlas et par comparaison statistique et valorisation des travaux

Figure 4.1 – Organisation du chapitre 4 de ce manuscrit et principaux points abordés.

## 4.1 Analyse fonctionnelle par comparaison statistique des intensités des pixels des volumes autoradiographiques

L'analyse fonctionnelle par comparaison statistique des intensités des pixels d'images de différents groupes émerge depuis une vingtaine d'années dans le domaine des neurosciences (cf. [paragraphe 1.5.2 \(p. 47\)](#)). Initialement développée pour étudier des images acquises chez l'Homme, cette méthode est aussi utilisée, depuis quelques années, pour analyser des images cérébrales acquises chez le Rongeur, dont la Souris. Afin de faciliter l'exploitation des données du petit animal, Sawiak *et al.* ont récemment adapté les fonctionnalités de la 5<sup>ème</sup> version du logiciel Statistical Parametric Mapping (SPM5) ([Sawiak et al., 2009](#)). Pour réaliser notre analyse fonctionnelle sans *a priori* sur nos images de cerveaux de souris, nous avons utilisé cette adaptation du logiciel, rebaptisée **SPMMouse**.

Notons qu'une approche similaire (utilisant SPM5, non optimisé pour l'étude sur le petit animal) a été menée sur ce même jeu de données en parallèle des travaux présentés ici ([Dubois et al., 2010b](#)). Les **enjeux importants** ici n'ont pas tant résidé dans la faisabilité ni le bien-fondé de l'approche d'analyse fonctionnelle par comparaison statistique des intensités des pixels d'images autoradiographiques de l'étude, mais plutôt dans la **pertinence de combiner l'approche atlas** que nous avons développée dans le [chapitre 3 \(p. 78\)](#) avec **l'approche citée ci-dessus**. La version SPMMouse ayant été disponible après le début de l'étude menée par Dubois *et al.*, il nous a semblé judicieux de réaliser de nouveau les tests effectués mais avec la nouvelle version du logiciel afin d'évaluer ses apports par rapport à SPM5 pour une étude sur le petit animal. La méthodologie d'analyse des données décrites dans cette section est donc similaire à celle décrite dans l'étude précédemment citée.

### 4.1.1 Normalisation des images fonctionnelles dans un référentiel commun

Pour être en mesure de comparer statistiquement l'intensité de pixels homologues dans chacun des volumes fonctionnels de l'étude, il a fallu au préalable normaliser toutes les images dans un référentiel commun, souvent défini par une image représentative de l'ensemble des données à étudier (le *template*). Travaillant sur des cerveaux tronqués (un seul hémisphère privé du bulbe olfactif et du cervelet), nous avons dû créer un *template* spécifique pour normaliser spatialement les volumes autoradiographiques.

#### 4.1.1.1 Création d'un *template* spécifique à l'étude

Le *template* spécifique à notre étude a été créé d'après le protocole décrit dans les travaux de Nguyen et Dubois (Nguyen et al., 2004; Dubois et al., 2008b). Les étapes réalisées sont décrites ci-dessous. L'ensemble de ces opérations a été effectué dans SPMMouse.

1. **Choix d'une image de référence** parmi celles de la base de données (souris PS1 et APP/PS1). La modalité choisie pour réaliser cette image représentative des données a été la photographie. En effet, les volumes photographiques ont une plus grande cohérence spatiale par rapport aux volumes histologiques et autoradiographiques (cf. paragraphe 2.2.3.1 (p. 73)). Les photographies des plans de coupe n'étant pas sujettes aux déformations secondaires, elles ne présentent pas d'artéfacts dus au processus de coupe. Les transformations non affines utilisées par la suite sont sensibles à de tels artéfacts. Aussi, la normalisation spatiale des données entre elles donne de meilleurs résultats si les transformations non affines sont estimées sur des volumes photographiques et non sur les volumes histologiques ou autoradiographiques (Dubois et al., 2010b). L'image de référence sélectionnée pour initier la création du *template* spécifique à cette étude a donc été un volume photographique, choisi parmi ceux appartenant au groupe des souris PS1 (cf. figure 4.2-1).
2. **Lissage spatial de l'image de référence.** Un filtre gaussien ( $FWHM = 3 \times$  la résolution des pixels de l'image) a été appliqué pour diminuer le bruit présent dans cette image (cf. figure 4.2-2).
3. **Normalisation spatiale** des volumes photographiques de la base de données. Des transformations affines et non affines ont été estimées pour recaler le volume photographique de chaque sujet sur l'image de référence lissée (cf. figure 4.2-3). La transformation non affine estimée dans SPMMouse était une combinaison linéaire de fonctions de base de cosinus connue sous l'acronyme "DCT", pour la formulation anglophone *Discrete Cosinus Transform* (Ashburner and Friston, 1999). Le critère de similarité utilisé pour estimer le meilleur appariement entre les images concernées était la somme des carrés de la différence (cf. équation 1.5 (p. 31)). Les intensités des pixels des volumes normalisés spatialement dans le référentiel de l'image de référence lissée ont été obtenues en interpolant linéairement les intensités des pixels des volumes initiaux. A la fin de cette étape, tous les volumes photographiques étaient dans un même référentiel spatial.
4. **Création d'une image moyenne.** Toutes les images normalisées dans le référentiel de l'image de référence ont ensuite été sommées pour créer une image moyenne (cf. figure 4.2-4).

5. **Lissage spatial de l'image moyenne.** Un filtre gaussien a de nouveau été appliqué sur l'image moyenne précédemment obtenue ( $FWHM = 3 \times$  la résolution des pixels de l'image) (cf. figure 4.2-5). Le résultat de cette étape a constitué le *template* utilisé par la suite, également nommé "*template photographique*" (encadré en rouge sur la figure 4.2).

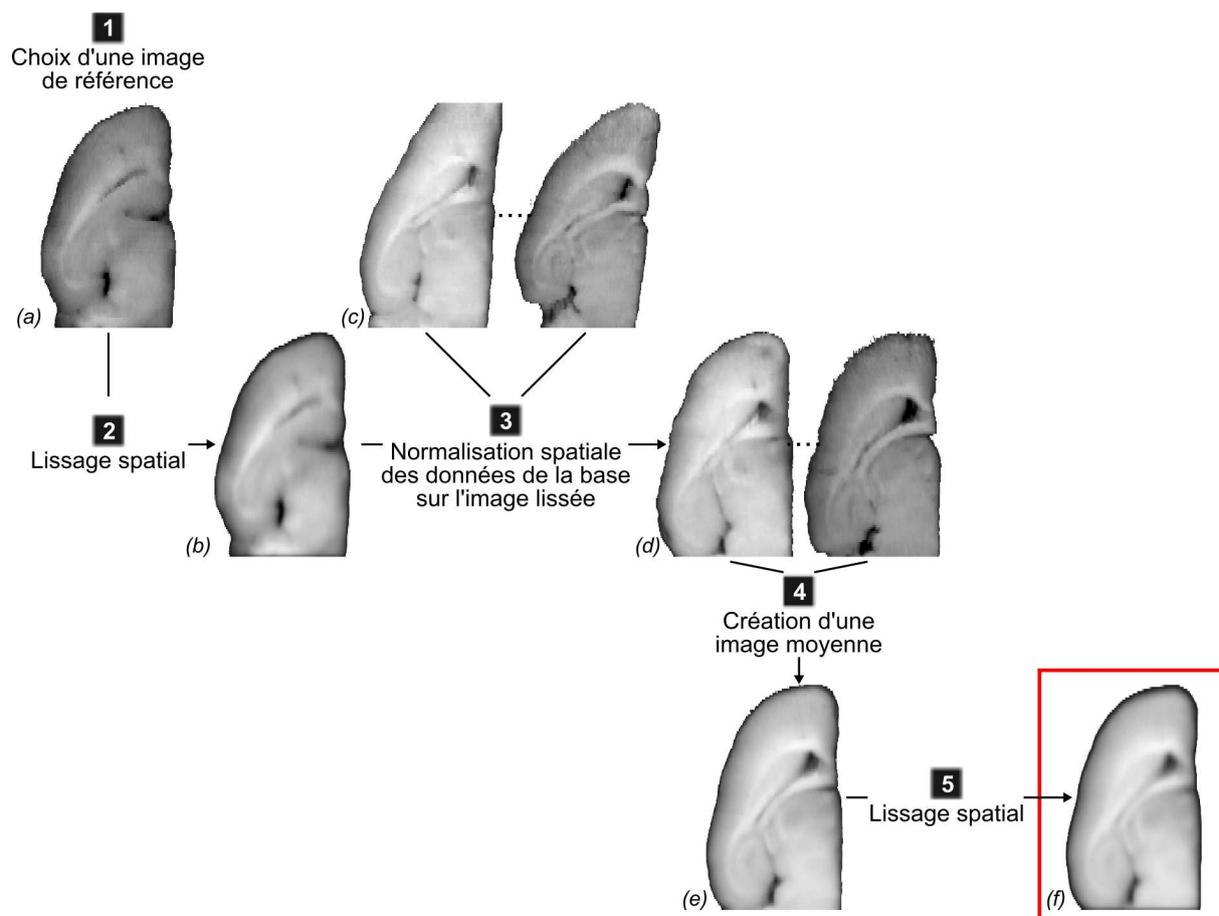


Figure 4.2 – Création du template spécifique à l'étude à partir d'une image photographique appartenant au groupe des souris PS1 (données illustrées sous incidence axiale). 1 : Choix d'une image de référence (a). 2 : Lissage spatial de cette référence par un filtre gaussien. 3 : Normalisation spatiale des images de la base de données (c) sur l'image de référence lissée (b). 4 : Création d'une image moyenne à partir des images normalisées (d). 5 : Lissage spatial de l'image moyenne (d) par un filtre gaussien. Le résultat de cette étape a fourni le template spécifique à l'étude (template photographique)(f).

#### 4.1.1.2 Normalisation des volumes autoradiographiques

Pour comparer statistiquement les intensités des pixels des images fonctionnelles de notre base de données, les opérations suivantes ont été effectuées :

1. **Normalisation spatiale** des images fonctionnelles. Des transformations affines et non affines ont été estimées pour recalibrer les volumes photographiques sur le *template* photographique (cf. [figure 4.3-1](#)) puis appliquées sur les volumes autoradiographiques correspondants (cf. [figure 4.3-1'](#)).
2. **Normalisation en intensité**. Les intensités de ces volumes autoradiographiques normalisés spatialement ont été normalisées selon la note de la fin du [chapitre 2](#) (p. 76) (cf. [figure 4.3-2](#)).
3. **Lissage spatial** des images normalisées. Un filtre gaussien a été appliqué sur chacune des images fonctionnelles précédemment normalisées spatialement et en intensité (FWHM = 3×la résolution des pixels de l'image) (cf. [figure 4.3-3](#)). Les images obtenues à la fin de cette étape ont été utilisées pour réaliser notre étude de groupes décrite dans le paragraphe suivant (encadrées en rouge sur la [figure 4.3](#)).

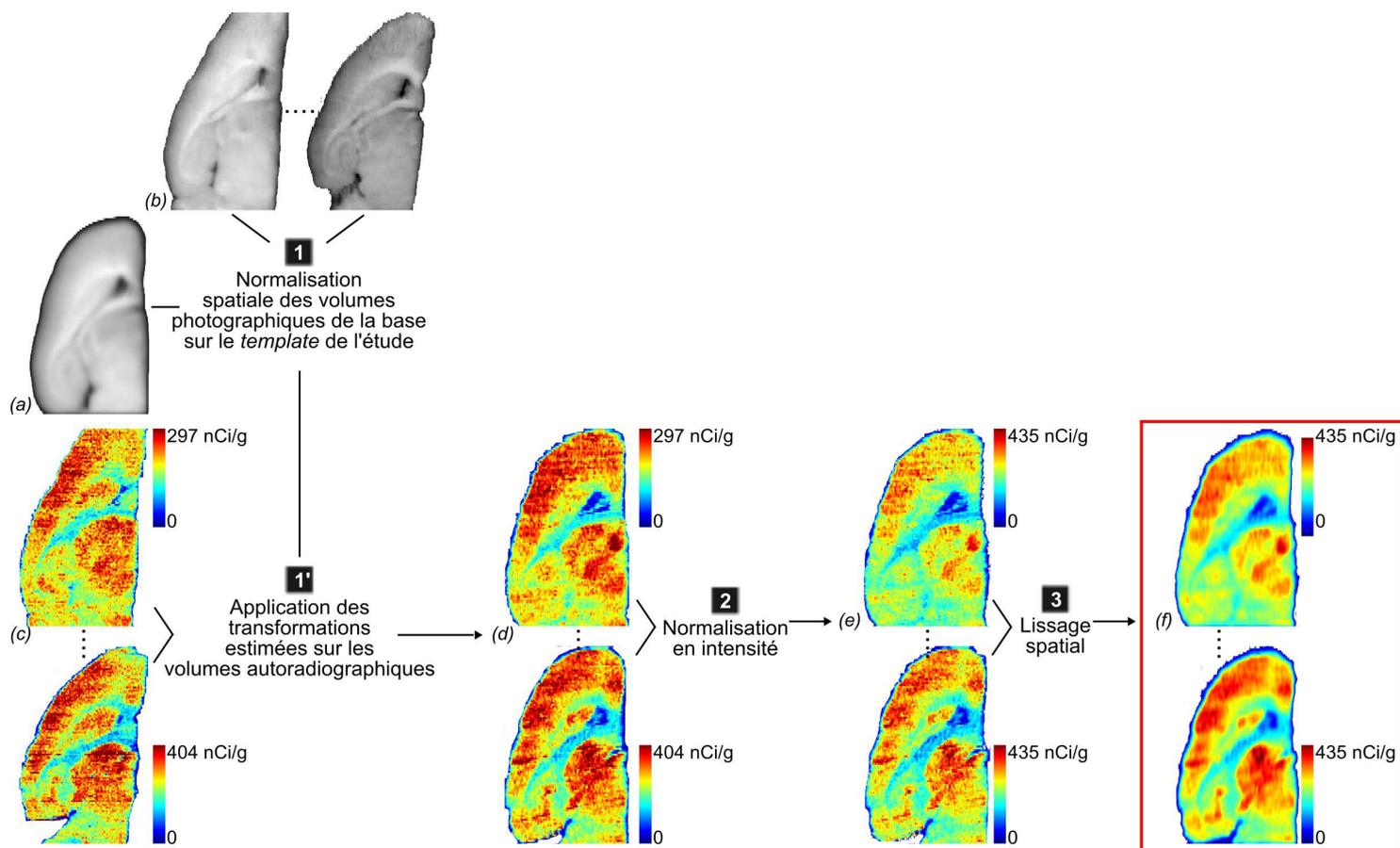


Figure 4.3 – Normalisation des volumes autoradiographiques. 1 : Normalisation spatiale des volumes photographiques de la base (b) sur le *template* créé pour cette étude (a). 1' : Application des transformations précédemment estimées sur les volumes autoradiographiques correspondants (c). 2 : Normalisation en intensité des images normalisées spatialement (d). 3 : Lissage spatial des images normalisées (e) par un filtre gaussien. Le résultat de cette étape a fourni les données à analyser par comparaison statistique des intensités des pixels (f).

#### 4.1.2 Étude statistique de groupes

Une étude de groupes a été réalisée pour évaluer les différences de prise de glucose entre les souris APP/PS1 (souris modélisant la maladie d'Alzheimer) et les souris PS1 (souris contrôles). Pour ce faire, nous avons comparé statistiquement les intensités des pixels homologues dans les volumes autoradiographiques, précédemment normalisés dans le référentiel du *template* créé spécifiquement pour l'étude.

#### 4.1.2.1 Modèle statistique

L'analyse statistique réalisée s'est appuyée sur le modèle linéaire général décrit dans le paragraphe 1.5.2 (p. 47).

Le test  $t$  de Student bilatéral non apparié, fourni dans SPMMouse, a été utilisé pour évaluer, de façon indépendante, deux contrastes :

1. **Hypométabolisme** (prise de glucose moins importante) dans certaines régions cérébrales des souris APP/PS1 par rapport à leurs régions homologues chez les souris PS1. L'hypothèse émise ici a été que les intensités de certains pixels des autoradiographies des souris APP/PS1 étaient plus faibles que celles des pixels homologues des autoradiographies des souris PS1.
2. **Hypermétabolisme** (prise de glucose plus importante) dans certaines régions cérébrales des souris APP/PS1 par rapport à leurs régions homologues chez les souris PS1. L'hypothèse émise ici a été que les intensités de certains pixels des autoradiographies des souris APP/PS1 étaient plus élevées que celles des pixels homologues des autoradiographies des souris PS1.

Pour diminuer le nombre de tests effectués, les pixels appartenant au fond des images et aux ventricules ont été exclus de l'analyse. Pour ce faire, nous avons seuillé les autoradiographies, en utilisant le logiciel SPMMouse, pour ne conserver que les pixels dont l'intensité, dans toutes les images, était au moins égale à 80% de la valeur moyenne des intensités des pixels des images <sup>a</sup>.

A l'issue de ces tests, deux cartes paramétriques, de valeurs  $T$  (définies par l'équation 1.17 (p. 49)), représentant respectivement les zones cérébrales des souris APP/PS1 en hypo- puis en hypermétabolisme par rapport aux zones homologues chez les souris PS1 ont été obtenues. Nous nous sommes ensuite appuyés sur des travaux similaires (Nguyen et al., 2004; Lee et al., 2005b; Dubois et al., 2008b, 2010b) et avons choisi pour seuil de significativité statistique 0,01 (non corrigé pour les comparaisons multiples). Seuls les *clusters* contenant au minimum 1500 pixels connexes ont par ailleurs été retenus. La résolution des autoradiographies étant de  $0,021 \times 0,021 \times 0,080$  mm<sup>3</sup> (cf. paragraphe 2.2.3.1 (p. 74)), ces agrégats de pixels ont représenté des zones dont la taille minimale valait  $\sim 0,05$ mm<sup>3</sup>.

---

a. La moyenne retenue a été en réalité la moyenne des intensités des pixels supérieure à un huitième de la moyenne de tous les pixels (Friston et al., 2007).

#### 4.1.2.2 Évaluation des différences métaboliques détectées

Une fois les *clusters* extraits des cartes paramétriques, les activités moyennes (en nCi/g) contenues dans chacune de ces zones détectées par l'analyse statistique ont été mesurées. Pour ce faire, des commandes BrainVISA ont été utilisées. Les valeurs obtenues pour les animaux de chaque groupe ont été ensuite moyennées. Les résultats finaux ont été pondérés par l'erreur type de la moyenne (SEM) et les pourcentages de différence des mesures d'activité entre les deux lignées transgéniques ont été calculés.

#### 4.1.2.3 Synthèse des résultats de l'analyse statistique

##### *Zones représentant des différences du métabolisme entre les deux lignées*

L'analyse statistique réalisée dans SPMMouse (considérant un seuil de significativité à 0,01 et une taille minimale de *clusters* fixée à 1500 pixels) a permis de mettre en évidence 9 et 8 zones cérébrales chez les souris APP/PS1 dans lesquelles la prise de glucose a été respectivement moins et plus importante que dans les zones homologues chez les souris PS1. Les figures 4.4(a) et (b) illustrent en 3D ces *clusters* représentant respectivement les hypo- et hypermétabolismes chez les souris APP/PS1. Ces figures montrent qu'il existe plus de zones où les souris APP/PS1 sont en hypométabolisme par rapport aux souris PS1 que de zones où les souris modélisant la maladie d'Alzheimer sont en hypermétabolisme par rapport aux souris contrôles. Ces figures montrent d'autre part que ces zones où le métabolisme diffère selon la lignée transgénique se situent de part et d'autre de l'hémisphère.

Les figures 4.4(c) et (d) représentent sur une coupe histologique, normalisée spatialement *via* SPMMouse sur le *template* spécifique à l'étude, les projections de ces *clusters*. Nous observons que, même en s'appuyant sur un atlas détaillé (par exemple celui de Paxinos and Franklin (2001)), il est parfois difficile d'attribuer un *cluster* à une région anatomique particulière. Aussi, pour cette partie de l'étude, nous avons identifié les *clusters* détectés par l'analyse statistique par des numéros arbitraires.

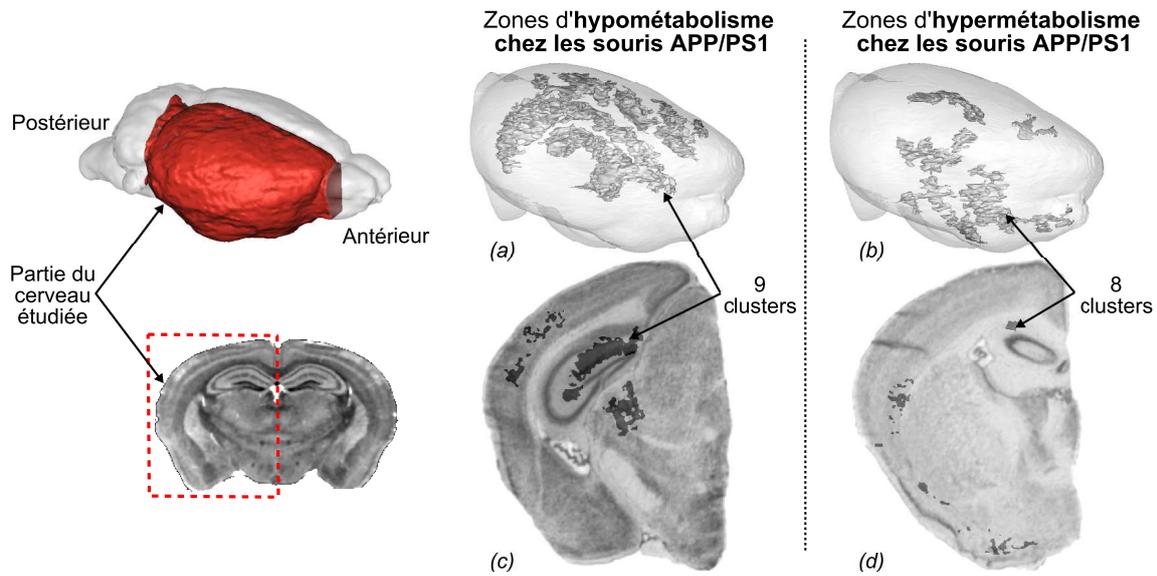


Figure 4.4 – Clusters de pixels, représentés en 3D, résultant des analyses par comparaison statistique pour les contrastes représentant les hypo- et hypermétabolismes chez les souris APP/PS1 ((a) et (b)) dans un rendu surfacique du template spécifique à l'étude. Nous observons qu'il existe plus de zones où les souris APP/PS1 sont en hypométabolisme par rapport aux souris PS1 qu'en hypermétabolisme par rapport à ces mêmes souris. L'ensemble de ces zones se situent de part et d'autre de l'hémisphère. Des projections de ces clusters sont superposées en (c) et en (d) sur une coupe histologique normalisée sur le template spécifique à l'étude. Ces vues coronales montrent qu'il est parfois difficile de localiser précisément un cluster dans une région anatomique.

#### Analyse fonctionnelle au sein des clusters détectés

Les prises moyennes de glucose de chaque groupe de souris mesurées en nCi/g dans les zones résultant de l'analyse statistique et pondérées par l'erreur type de la moyenne (SEM) sont présentées dans le [tableau 4.1](#). Les pourcentages de différence de ces mesures d'activité entre les deux groupes figurent également sur ce tableau.

Le [tableau 4.1\(a\)](#) montre les résultats obtenus pour le contraste de l'analyse statistique reflétant les zones d'hypométabolisme détectées chez les souris APP/PS1 comparées aux souris PS1. En moyennant les valeurs mesurées dans les *clusters*, nous avons trouvé que la prise de glucose chez les souris modélisant la maladie d'Alzheimer (APP/PS1) était  $\sim 19\%$  plus faible que celle mesurée dans les mêmes zones chez les souris contrôles (PS1).

Les résultats obtenus pour le contraste de l'analyse statistique reflétant les zones d'hypermétabolisme détectées chez les souris APP/PS1 comparées aux souris PS1 sont dans le [tableau 4.1\(b\)](#). En moyennant les valeurs mesurées dans les *clusters*, nous avons trouvé que la prise de glucose chez les souris modélisant la maladie d'Alzheimer est  $\sim 26\%$  plus élevée que celle mesurée dans les mêmes zones chez les souris contrôles.

<i>n</i> <sup>o</sup> du <i>cluster</i>	Souris PS1 (n = 3) $\overline{\mu_{act}} \pm SEM$ (nCi/g)	Souris APP/PS1 (n = 4) $\overline{\mu_{act}} \pm SEM$ (nCi/g)	% de différence d'activité entre les groupes
<b>(a) Clusters représentant les zones de prise de glucose plus faible chez les souris APP/PS1 que chez les souris PS1</b>			
1	307,22 ± 1,80	255,01 ± 0,49	-16,99
2	366,22 ± 13,88	275,88 ± 2,97	-24,67
3	319,97 ± 3,86	270,24 ± 3,49	-15,54
4	320,78 ± 2,64	265,28 ± 1,15	-17,30
5	333,07 ± 9,39	264,88 ± 1,74	-20,47
6	302,83 ± 3,24	241,31 ± 2,40	-20,31
7	282,91 ± 2,52	228,37 ± 2,94	-19,28
8	336,98 ± 6,09	275,56 ± 2,24	-18,23
9	338,87 ± 3,66	281,03 ± 5,85	-17,07
<b>(b) Clusters représentant les zones de prise de glucose plus élevée chez les souris APP/PS1 que chez les souris PS1</b>			
1	171,28 ± 14,48	278,26 ± 6,22	+62,46
2	240,33 ± 2,34	283,98 ± 2,21	+18,16
3	256,06 ± 0,55	309,03 ± 4,13	+20,69
4	238,51 ± 2,05	294,80 ± 2,17	+23,60
5	190,77 ± 3,97	238,39 ± 2,33	+24,97
6	260,64 ± 1,87	297,08 ± 1,86	+13,98
7	272,08 ± 7,02	345,86 ± 7,08	+27,12
8	209,88 ± 2,25	247,63 ± 1,58	+17,99

Tableau 4.1 – Activité moyenne par groupe ( $\overline{\mu_{act}}$ , en nCi/g) mesurée dans chacune de ces zones définies par les deux contrastes de l'analyse statistique (hypo- (a) et hypermétabolisme (b) des souris APP/PS1) et pondérée par l'erreur type de la moyenne (SEM). La colonne de droite montre les pourcentages de différence des mesures d'activité moyenne entre les deux groupes d'animaux. En moyennant les résultats obtenus pour le contraste représentant l'hypométabolisme chez les souris APP/PS1, nous avons trouvé que la prise de glucose chez ces souris était ~19% plus faible que celle mesurée dans les mêmes zones chez les souris PS1. La même opération effectuée pour le contraste représentant l'hypermétabolisme chez les souris APP/PS1 a montré que la prise de glucose chez ces souris était ~26% plus élevée que celle mesurée dans les mêmes zones chez les souris PS1.

### 4.1.3 Discussion des résultats de l'approche d'analyse par comparaison statistique des intensités des pixels des images

#### 4.1.3.1 Analyse fonctionnelle des données de l'étude

En parallèle de cette partie de travail de thèse, une étude similaire a été menée, sur ce même jeu de données, avec la 5<sup>ème</sup> version de SPM (SPM5), non optimisée pour l'étude sur le petit animal (Dubois *et al.*, 2010b). Les mesures de prise de glucose sur les volumes autoradiographiques normalisés sont globalement équivalentes entre les deux études, probablement du fait de l'adaptation des paramètres de normalisation spatiale des données apportée à SPMouse (cf. paragraphe 1.5.2 (p. 47)).

Dans l'étude menée par Dubois *et al.*, seuls les résultats des *clusters* jugés de taille significative ont été reportés. L'identification des *clusters* de pixels a été réalisée visuellement par un expert. L'analyse visant à comparer le métabolisme de chaque groupe de souris a ensuite été menée en fusionnant les informations fonctionnelles mesurées dans les *clusters* localisés dans une même région anatomique (exemple de la fusion des *clusters* localisés dans le striatum pour le contraste représentant l'hypométabolisme chez les souris APP/PS1). Les résultats de notre analyse, reportés dans le [tableau 4.1](#), n'ont pas pu être directement comparés avec ceux de l'étude précédemment citée. Néanmoins, pour chaque contraste étudié, les **métabolismes et pourcentages de différence de prise de glucose entre les groupes** mesurés pour chaque *cluster* de pixels **ont été du même ordre de grandeur entre les deux études**. Notons que dans l'étude de Dubois *et al.*, une différence de prise de glucose de 35,6 % a été détectée au sein d'un *cluster* résultant du contraste "hypométabolisme chez les souris APP/PS1" (identifié comme appartenant au cortex cingulaire<sup>b</sup>). Nos résultats du [tableau 4.1\(a\)](#) n'ont pas reporté une telle variation. A l'inverse, notre étude sur l'hypermétabolisme chez les souris APP/PS1 a détecté une différence de prise de glucose de 62,46 % pour le *cluster* n° 1 (cf. [tableau 4.1\(b\)](#)); une telle différence n'a pas été reportée dans Dubois *et al.* (2010b). Ces constatations peuvent résulter des différences entre les paramètres de normalisation des deux versions du logiciel d'analyse et/ou de la manière dont les *clusters* ont été analysés dans l'étude Dubois *et al.* (2010b).

Les résultats de notre analyse fonctionnelle par l'approche d'analyse par comparaison statistique des intensités des pixels des volumes autoradiographiques ont montré qu'il existait chez les souris modélisant la maladie d'Alzheimer des zones cérébrales consommant significativement moins (9 *clusters* ont été détectés pour ce contraste) et plus (8 *clusters* ont été détectés pour ce contraste) de glucose que ces mêmes zones cérébrales chez les souris contrôles.

---

b. Le cortex cingulaire est une partie du cerveau située sur la partie médiale du cortex, au-dessus et le long du corps calleux.

Les pourcentages de différence de prise de glucose, calculés pour chaque *cluster* détecté et entre les lignées, étant plus important que la variabilité intra-lignée (représentée par l'erreur type de la moyenne), nous avons confirmé que **cette approche d'analyse permettait de révéler des différences fonctionnelles significatives entre les deux lignées de souris**. Ces résultats doivent cependant être considérés comme préliminaires du fait du nombre limité de souris traitées dans cette étude.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par des travaux antérieurs ; un large comparatif des résultats est détaillé dans [Dubois et al. \(2010b\)](#). Notons que les résultats obtenus par l'approche d'analyse par atlas n'ont pas permis pas un tel niveau d'analyse (cf. section 3.4 (p. 109)).

#### 4.1.3.2 Outils de normalisation spatiale utilisés

Afin d'être en mesure de comparer nos résultats avec ceux obtenus dans [Dubois et al. \(2010b\)](#), nous avons appliqué la même méthodologie d'analyse des données, notamment en ce qui concerne la normalisation spatiale des volumes autoradiographiques dans un référentiel commun. Le *template* spécifique à l'étude ainsi que cette normalisation spatiale des images ont été réalisés en utilisant les outils de recalage d'images paramétrés dans SPMMouse : une combinaison linéaire de fonctions de base de cosinus a été utilisée pour normaliser non linéairement les données. Les travaux présentés dans le [chapitre 3 \(p. 78\)](#) de ce manuscrit ont montré que nous pouvions recaler des images multi-modales en estimant par FFD une transformation non affine. Il serait ainsi intéressant de mener une étude visant à comparer les résultats discutés précédemment, avec ceux obtenus par une approche d'analyse par comparaison statistique mais dont les volumes analysés auraient été recalés entre eux grâce à la méthode FFD.

#### 4.1.3.3 Limitations de cette approche d'analyse pour les études menée sur la Souris

La [figure 4.4](#) illustre la principale limitation de l'utilisation de cette approche d'analyse pour étudier des images autoradiographiques acquises chez la Souris. Il est **difficile d'identifier les structures anatomiques où se trouvent les *clusters*** représentant des différences fonctionnelles entre les groupes d'animaux. L'interprétation des résultats obtenus par une telle analyse s'appuie généralement sur des observations des projections des *clusters* sur des images anatomiques, telles que celles montrées en [figures 4.4\(c\)](#) et [\(d\)](#) ; elle est par conséquent fortement dépendante de l'expert en charge de cette tâche.

Les résultats de cette étude ont par ailleurs été obtenus en effectuant un test statistique dont le seuil de significativité a été fixé à 0,01 (non corrigé pour les comparaisons multiples). Nombre d'entre eux peuvent s'avérer être des faux positifs. Pour contrôler le nombre de faux positifs, nous avons voulu appliquer la correction du FDR dans ce modèle statistique. Aucun *cluster* n'ayant été détecté, nous en avons déduit que ce taux ne pouvait pas être estimé sur une telle base de données (nombre limité d'animaux et nombre important de pixels testés ( $5 \cdot 10^6$  pixels, fond de l'image exclu)).

Considérant ces limitations ainsi que celles de l'approche d'analyse par atlas, nous avons proposé de **combiner ces deux approches d'analyse afin d'optimiser l'interprétation des résultats obtenus**. Dans les sections suivantes, la stratégie pour coupler ces méthodes d'analyse est développée et les résultats obtenus sont présentés.

## 4.2 Indexation automatique par atlas des zones de variations d'activités cérébrales

### 4.2.1 État de l'art

L'indexation automatique de zones de variations d'activités cérébrales par des segmentations a été mise en œuvre pour analyser des images fonctionnelles (TEP, IRMf) acquises sur l'Homme (Tzourio-Mazoyer *et al.*, 2002; Eickhoff *et al.*, 2005; Lehericy *et al.*, 2006).

Dans leur étude, Tzourio-Mazoyer *et al.* ont segmenté manuellement le *template* IRM fourni par le Montreal Neurological Institute (MNI) (Collins *et al.*, 1994) en utilisant un logiciel de leur laboratoire Voxeline (Diallo *et al.*, 1998). Trois procédures ont ensuite été codées dans le logiciel SPM pour pouvoir indexer, selon les segmentations réalisées, les *clusters* détectés par l'analyse statistique. La première méthode a consisté à labelliser chaque *cluster* en fonction de la région dans laquelle se trouvait le pixel du *cluster* en question présentant la différence statistique la plus importante entre les groupes étudiés. Cette technique, couramment utilisée, peut engendrer de mauvaises interprétations des résultats dans le cas où les images étudiées ont des artefacts importants. La deuxième méthode a consisté à créer une sphère centrée au maximum local précédemment extrait puis à calculer le nombre de pixels à l'intersection de la sphère et des segmentations du *template*. Le *cluster* a ensuite été indexé dans la structure dont le pourcentage de recouvrement par rapport à la surface totale de la sphère était le plus élevé. Enfin, la dernière méthode proposée par cette équipe s'est appuyée sur la deuxième méthode en considérant cette fois-ci non plus le volume d'une sphère, mais celui du *cluster* détecté.

De leur côté, Eickhoff et ses collaborateurs ont utilisé des atlas paramétriques, cartographiant une sous-partie du cortex cérébral humain. L'origine du référentiel de ces atlas a été obtenue après translation de l'origine du référentiel du *template* du MNI. L'indexation, dans les segmentations définies, des *clusters* représentant des différences fonctionnelles entre les groupes a d'abord été réalisée visuellement. Les procédures d'indexation automatique se sont appuyées sur les méthodes décrites dans Tzourio-Mazoyer *et al.* (2002), à savoir le calcul du pourcentage de recouvrement entre les *clusters* détectés et les régions segmentées ainsi que la détermination du pixel représentant la plus grande variation inter-groupe. Cette équipe a également comparé le volume des *clusters* indexés dans une région avec le volume de la région en question afin d'évaluer si le phénomène mis en évidence couvrait l'intégralité d'une structure ou seulement une sous-partie de celle-ci. Eickhoff *et al.* ont mis à la disposition de la communauté scientifique ces atlas probabilistes ainsi que les méthodes d'analyse de *clusters* via une boîte à outils SPM (*SPM Anatomy toolbox*) fonctionnant également avec d'autres logiciels d'analyse par comparaison statistique (AFNI, FSL et FMRISTAT).

Enfin, Lehéricy *et al.* n'ont pas directement segmenté le *template* IRM utilisé pour normaliser les images à analyser. Cette équipe a en effet choisi de recaler sur leurs images, par transformation affine, un atlas des ganglions de la base et du thalamus décrit dans Yelnik *et al.* (2003).

L'utilisation des outils proposés par les équipes de Tzourio-Mazoyer et Eickhoff implique que les données à analyser aient été au préalable normalisées dans le référentiel du *template* du MNI (ou dans le référentiel des atlas paramétriques définis dans l'étude d'Eickhoff). Cette contrainte n'a donc pas pu être respectée pour notre étude ; nous n'avons pas pu utiliser leurs outils. Notre projet étant bâti autour d'images acquises sur des demi-cerveaux de souris, un *template* spécifique à notre étude a dû être créé pour l'analyse par comparaison statistique. Aussi, l'approche adoptée par l'équipe de Lehéricy nous a paru transposable à notre projet : nous avons choisi de **recaler un atlas numérique sur nos volumes autoradiographiques normalisés spatialement** pour l'étude décrite en section 4.1 (p. 117). Les cartes paramétriques résultant de l'analyse par comparaison statistique étant dans le référentiel de ces données normalisées, nous avons pu **superposer les segmentations de l'atlas sur ces cartes paramétriques** seuillées. A notre connaissance, cette approche n'a pas été mise en œuvre pour des études fonctionnelles menées chez le Rongeur.

Pour réaliser les travaux décrits dans la suite de ce chapitre, nous nous sommes servis de l'atlas du CIVM, utilisé pour l'analyse des volumes *post mortem* décrite en section 3.4 (p. 109) ainsi que des résultats obtenus par l'analyse par comparaison statistique décrite en section 4.1 (p. 117).

Note : Dans l'étude de Dubois *et al.* (2010b), les auteurs ont identifié des différences du métabolisme entre les deux groupes de souris dans plusieurs sous-parties du cortex cérébral, notamment au niveau du cortex cingulaire et du cortex rétrospénial. En l'état, l'atlas que nous avons utilisé ne pouvait pas détecter ces variations fonctionnelles inter-groupe car la région corticale du modèle numérique a été définie par une unique segmentation. Aussi, pour évaluer si une segmentation plus fine du cortex était capable de fournir des résultats cohérents avec ceux obtenus par Dubois *et al.*, l'expert en neuroanatomie a extrait la région d'intérêt nommée par la suite "cortex cingulaire et rétrospénial" de la région corticale définie dans l'atlas. Pour ce faire, il s'est appuyé sur l'IRM pondérée en T1 (les parties cingulaire et rétrospéniale du cortex étant difficilement discernables sur cette image, les deux parties ont été fusionnées). La région corticale n'appartenant pas à cette nouvelle segmentation a été nommée par la suite "reste du cortex".

## 4.2.2 Normalisation de l'atlas numérique dans le référentiel des cartes paramétriques

Avant de superposer les segmentations de l'atlas sur nos cartes paramétriques seuillées, nous avons dû vérifier que l'atlas numérique pouvait être correctement recalé sur les images normalisées dans le référentiel du *template* photographique.

### 4.2.2.1 Méthodologie appliquée

Déformer l'atlas numérique dans le référentiel des volumes autoradiographiques normalisés spatialement équivaut à le déformer dans le référentiel du *template* spécifique de l'étude ; autrement dit nous avons recalé l'atlas numérique sur le *template* photographique. Pour parvenir à recalcr ces deux images, **nous avons utilisé la stratégie de recalage proposée dans le chapitre 3 (p. 78). Nous avons estimé des transformations rigides, affines et non affines entre l'IRM pondérée en T1 utilisée pour créer l'atlas numérique et le *template* photographique. Les paramètres de déformation ainsi estimés ont ensuite été appliqués sur l'atlas numérique** afin que ses segmentations puissent être dans le référentiel du *template* photographique, et par conséquent dans celui des cartes paramétriques seuillées résultant des analyses statistiques.

### 4.2.2.2 Évaluations du recalage de l'atlas sur le *template* photographique

Les outils et critères d'évaluation de la qualité du recalage de l'atlas sur les données à analyser ont été ceux utilisés pour l'étude de faisabilité de l'analyse par atlas des images natives de la base de données (cf. paragraphe 3.2.1 (p. 91)).

#### *Évaluation qualitative du recalage*

Pour évaluer qualitativement le recalage de l'IRM pondérée en T1 sur le *template* photographique, les contours de l'IRM ont été superposés sur une image histologique normalisée spatialement en utilisant SPMouse sur le *template* spécifique de l'étude. La figure 4.5 illustre, sous une incidence coronale, la superposition de ces images avant (cf. figure 4.5(a)) et après recalage, *i.e.* une fois les transformations rigides, affines et non affines estimées et appliquées à l'IRM (cf. figure 4.5(b)). Nous observons qu'après recalage, aussi bien les contours des structures externes (flèches pleines n° 1) que ceux des structures internes telles que le corps calleux (flèches pleines n° 2) ou l'hippocampe (flèches pleines n° 3) de l'IRM se superposent correctement à ces régions bien mises en évidence par le marquage au violet de crésyl.

Comme pour l'étude de faisabilité décrite en [paragraphe 3.2.1](#) (p. 91), nous avons appliqué les paramètres de déformation à une grille formée de plans perpendiculaires et régulièrement espacés entre eux. La [figure 4.5\(c\)](#) montre que la transformation non linéaire, basée sur l'utilisation de  $\mathcal{B}$ -splines cubiques, a déformé de façon régulière l'IRM pour la mettre en correspondance sur le *template* photographique (flèche pointillée n° 1).

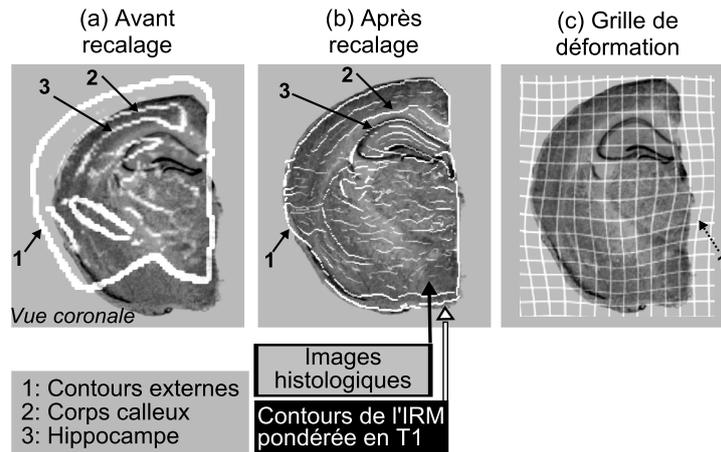


Figure 4.5 – Évaluation qualitative du recalage de l'IRM pondérée en T1 sur le template photographique par superposition des contours de l'IRM (en blanc) sur une image histologique normalisée dans le référentiel du template photographique avant (a) et après recalage (b). Nous observons qu'après recalage, aussi bien les contours des structures externes (flèches pleines n° 1) que ceux des structures internes telles que le corps calleux (flèches pleines n° 2) ou l'hippocampe (flèches pleines n° 3) de l'IRM se superposent correctement à ces régions bien mises en évidence par le violet de crésyl. La grille en (c) montre que la transformation non linéaire n'a pas déformé de façon excessive l'IRM pour la mettre en correspondance sur le template photographique (flèche pointillée n° 1).

#### Évaluation quantitative du recalage

Pour évaluer quantitativement le recalage des images, les différences de volumes, coefficients de Dice et index de sensibilité ont été calculés entre des segmentations de l'atlas et des segmentations manuelles. Ces segmentations manuelles ont été celles réalisées pour l'étude précédente : segmentations des cortex, des hippocampes, des striata, des corps calleux et des substances noires, définies sur les volumes histologiques d'une souris PS1 (souris contrôle) et d'une souris APP/PS1 (souris modélisant la maladie d'Alzheimer).

Pour être capable de mesurer la concordance des segmentations une fois l'atlas recalé sur le *template* photographique, nous avons appliqué aux segmentations manuelles, les transformations estimées entre les volumes photographiques individuels et le *template* photographique (cf. figure 4.6). Les critères de superposition énoncés plus haut ont été calculés une fois l'ensemble des segmentations normalisées dans le référentiel du *template* photographique.

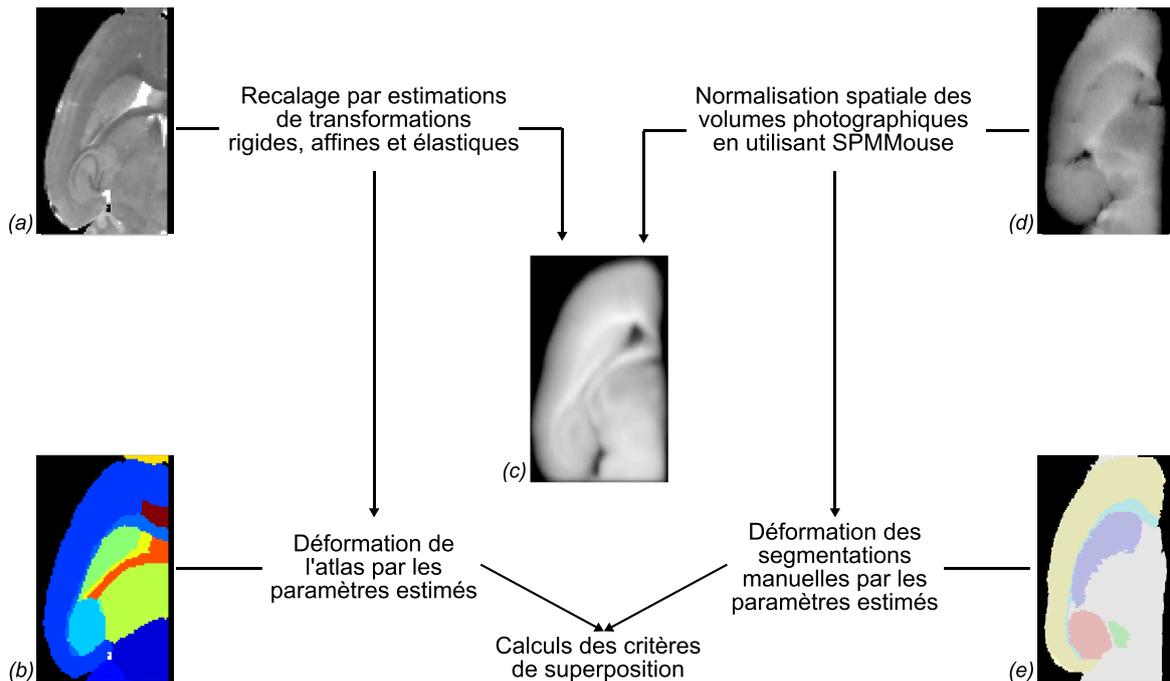


Figure 4.6 – Recalages effectués pour évaluer quantitativement l'appariement des données : des transformations rigides, affines et élastiques ont été estimées pour mettre en correspondance l'IRM (a) avec le template photographique (c) ; l'atlas (b) créé à partir de l'IRM (a) a été déformé avec ces paramètres estimés. Les volumes photographiques des sujets segmentés manuellement (d) ont été normalisés spatialement sur le template photographique en utilisant les fonctionnalités de SPMouse. Les paramètres estimés ont été appliqués aux segmentations manuelles correspondantes (e) afin de les normaliser dans le référentiel du template photographique. Les critères de superposition ont été calculés entre les segmentations manuelles et celles définies dans l'atlas une fois normalisées dans le référentiel du template photographique.

Les résultats de cette évaluation quantitative sont présentés dans le [tableau 4.2](#).

	Souris PS1 (ctrl)			Souris APP/PS1 (modèle MA)		
	$\Delta_V$	$\kappa$	Se	$\Delta_V$	$\kappa$	Se
Cortex	0,06	0,83	0,86	0,04	0,74	0,73
Corps calleux	0,27	0,55	0,49	0,01	0,31	0,31
Hippocampe	0,16	0,83	0,77	0,08	0,75	0,72
Striatum	0,12	0,83	0,78	0,04	0,75	0,77
Substance noire	0,11	0,42	0,40	0,02	0,52	0,52

Tableau 4.2 – Critères de superposition (Différences de volumes ( $\Delta_V$ ), Coefficients de Dice ( $\kappa$ ) et Index de sensibilité (Se)) calculés entre cinq segmentations de l'atlas recalé sur le template photographique et celles réalisées manuellement sur une souris PS1 (souris contrôle "ctrl") et une souris APP/PS1 (souris modélisant la maladie d'Alzheimer "MA") puis normalisées spatialement sur le template photographique : segmentations du cortex cérébral, du corps calleux, de l'hippocampe, du striatum et de la substance noire. Les scores finaux moyens que l'atlas a été capable de localiser globalement ces structures cérébrales sur le template photographique.

Les scores obtenus pour les différences de volumes calculées entre les segmentations de l'atlas recalé sur le *template* photographique et les segmentations manuelles montrent que l'atlas a été capable de mesurer sur le *template* photographique, le volume :

- du cortex cérébral avec une moyenne des erreurs de 5 % (ce qui représente  $\sim 4 \text{ mm}^3$  pour un hémisphère) ;
- du corps calleux avec une moyenne des erreurs de 14 % (ce qui représente moins de  $1 \text{ mm}^3$  pour un hémisphère) ;
- de l'hippocampe avec une moyenne des erreurs de 12 % (ce qui représente moins de  $2 \text{ mm}^3$  pour un hémisphère) ;
- du striatum avec une moyenne des erreurs de 8 % ; (ce qui représente  $\sim 1 \text{ mm}^3$  pour un hémisphère)
- de la substance noire avec une moyenne des erreurs de 7 % (ce qui représente  $\sim 0,1 \text{ mm}^3$  pour un hémisphère).

En moyennant les coefficients de Dice calculés pour les structures de grande taille (cortex, hippocampe et striatum) chez les deux souris, nous avons obtenu un score moyen de  $\sim 0,79$ . La moyenne des index de sensibilité obtenus pour ces mêmes structures s'est élevée à  $\sim 0,77$ . Pour le corps calleux (structure fine) et la substance noire (structure profonde de petite taille), ces scores sont plus faibles (score moyen pour les coefficients de Dice valait  $\sim 0,45$ , celui pour les index de sensibilité était de  $\sim 0,43$ ). Ces scores attestent que l'atlas a été capable de localiser correctement les structures de grande taille sur le *template* photographique. L'identification par l'atlas des structures fines et petites sur le *template* photographique est elle plus incertaine ; la détection par l'atlas de *clusters* dans ces régions cérébrales doit donc être vérifiée.

### 4.2.3 Indexation automatique des *clusters* basée sur les segmentations de l'atlas

#### 4.2.3.1 Superposition de l'atlas recalé sur les cartes paramétriques seuillées

Les évaluations qualitatives et quantitatives du recalage de l'atlas sur le *template* photographique attestent que, une fois recalées par la stratégie proposée dans le chapitre 3 (p. 78), les segmentations de l'atlas ont été capables d'identifier les principales structures cérébrales de cerveau de souris dans le référentiel du *template*. Nous avons donc pu superposer l'atlas sur les cartes paramétriques seuillées résultant des analyses statistiques décrites dans la section 4.1 (p. 117). La fusion de ces images a permis d'identifier les structures cérébrales auxquelles appartenaient les *clusters*.

Les figures 4.7(a) et (b) illustrent la superposition des segmentations de l'atlas recalé<sup>c</sup> sur le *template* photographique avec des projections des *clusters* détectés sur des coupes histologiques normalisées spatialement sur le *template* photographique (mêmes coupes que celles illustrées sur les figures 4.4(c) et (d) (p. 124)). Alors que sur les figures 4.4(c) et (d) il était difficile de prime abord d'attribuer les *clusters* de pixels à des régions anatomiques, les figures 4.7(a) et (b) donnent immédiatement une première indexation.

Les *clusters* observés sur la figure 4.7(a) appartiennent au cortex cingulaire et rétrospénial, au reste du cortex, au thalamus et à l'hippocampe. En parcourant la superposition de ces images 3D, nous avons observé que les *clusters* se situaient dans l'une de ces quatre régions ou dans le tronc cérébral, le cervelet, le corps calleux, le colliculus inférieur ou supérieur, la capsule interne, la région associant le septum et la fimbria, le striatum ou les ventricules.

Les *clusters* observés sur la figure 4.7(b) appartiennent au reste du cortex et à l'hippocampe. En parcourant la superposition de ces images 3D, nous avons observé que les *clusters* résultant de cette analyse statistique se situaient dans l'une de ces deux régions ou dans l'amygdale, la commissure antérieure, le corps calleux, le bulbe olfactif ou le striatum.

---

c. Ces figures illustrent des *projections* (2D) des segmentations de l'atlas (3D), expliquant ainsi l'aspect irrégulier des régions cérébrales.

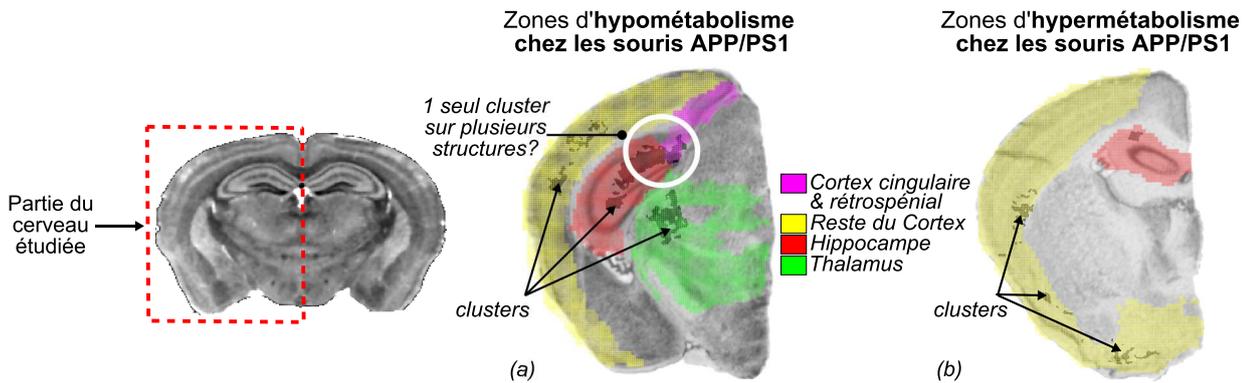


Figure 4.7 – Fusion de segmentations de l'atlas recalé, des projections des clusters détectés pour les contrastes représentant les hypo- et hypermétabolismes chez les souris APP/PS1 ((a) et (b)) et des coupes histologiques normalisées sur le template photographique. Ces superpositions montrent que en (a), les clusters appartiennent au cortex cingulaire et rétrospénial, au reste du cortex, au thalamus et à l'hippocampe; en (b), les clusters se situent dans le reste du cortex et dans l'hippocampe. Le cercle blanc (a) semble indiquer qu'un même cluster peut appartenir à plusieurs structures.

#### 4.2.3.2 Analyse qualitative de la répartition des *clusters* dans le cerveau de souris

La figure 4.7(a) montre qu'un même *cluster* peut appartenir à plusieurs structures cérébrales (cercle blanc sur la figure). Pour s'affranchir des éventuelles effets de projections des objets tridimensionnels sur des vues 2D, nous avons observé, en 3D, la superposition des *clusters* résultant des analyses statistiques avec les segmentations de l'atlas recalé.

Les figures 4.8(a) et (b) illustrent d'autres zones représentant respectivement un hypo- et un hypermétabolisme chez les souris APP/PS1. Ces figures montrent bien qu'un même *cluster* de pixels résultant des analyses statistiques peut se situer sur plusieurs structures (sur les régions "cortex cingulaire et rétrospénial" et "reste du cortex" pour le *cluster* illustré en figure 4.8(a); et sur les régions "striatum" et "bulbe olfactif" pour le *cluster* illustré en figure 4.8(b)).

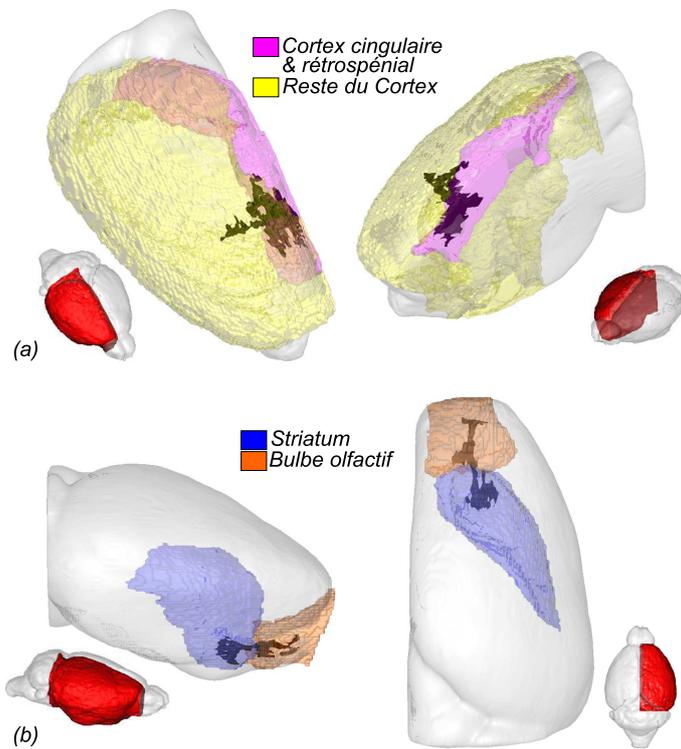


Figure 4.8 – Représentation en 3D de clusters de pixels (en noir) résultant des analyses par comparaison statistique pour les contrastes représentant l'hypo- et l'hypermétabolisme chez les souris APP/PS1 ((a) et (b)) et appartenant à plusieurs structures cérébrales. En (a), le cluster se situe à la fois dans les régions "cortex cingulaire et rétrospénial"(en violet) et "reste du cortex" (en jaune). En (b), une partie du cluster appartient au striatum (en bleu), l'autre partie se situe dans le bulbe olfactif (orange).

## 4.2.4 Discussion de la méthode et des résultats d'indexation automatique par atlas des *clusters* représentant les variations d'activité entre les groupes

### 4.2.4.1 Recalage de l'atlas sur le *template* photographique

Pour indexer automatiquement les *clusters* résultant des analyses statistiques, nous avons proposé de déformer un atlas numérique dans le référentiel des cartes paramétriques, *i.e.* dans le référentiel du *template* photographique créé pour réaliser cette étude. Le point critique a donc été de proposer une méthode de recalage de l'atlas sur ce *template* photographique et d'évaluer la mise en correspondance de ces images.

Pour recalcr ces images, la stratégie proposée dans le [chapitre 3](#) (p. 78) a été utilisée et réalisée grâce au module BrainVISA développé pour le projet.

La qualité du recalage des images a d'abord été évaluée qualitativement en superposant les contours de l'IRM sur un volume histologique, normalisé spatialement dans le référentiel du *template* photographique. La [figure 4.5\(b\)](#) (p. 132) atteste qu'aussi bien les structures internes, telles que l'hippocampe et le corps calleux, que celles en périphérie du cerveau ont été correctement superposées à leurs homologues appartenant à un volume normalisé spatialement sur le *template* photographique.

Le recalage a par la suite été évalué quantitativement. Pour ce faire, des critères de superposition (différences de volumes, index de Dice et de sensibilité) ont été calculés entre les segmentations de l'atlas recalé sur le *template* et des segmentations manuelles normalisées sur ce dernier (cf. [figure 4.6](#) (p. 133)). Les résultats obtenus (voir [tableau 4.2](#) (p. 134)) indiquent que l'atlas a été capable de segmenter sur le *template* photographique, les structures de taille importante. Pour le corps calleux (structure fine) et la substance noire (structure profonde et de petite taille), les scores ont été plus faibles. Ceci est probablement dû aux étapes de lissage et de normalisation des données nécessaires pour créer le *template* qui rendent peu discernables ces structures sur l'image représentative de l'étude. Leur identification par l'atlas a donc été plus complexe. L'interprétation d'informations volumiques et fonctionnelles émanant de ces structures doit donc être considérée avec précaution.

#### 4.2.4.2 Localisation automatique des *clusters* par les segmentations de l'atlas

La fusion des segmentations de l'atlas recalé sur les cartes paramétriques seuillées a permis de localiser rapidement les *clusters* résultant des analyses statistiques. Les observations ont montré que les zones de variations métaboliques entre les groupes de souris se situaient de part et d'autre de l'hémisphère et concernaient un grand nombre de régions cérébrales. Nous avons également observé que des **zones de prise de glucose plus faible chez les souris APP/PS1** par rapport aux souris PS1 avaient été **indexées dans les mêmes structures que des zones de prise de glucose plus élevée chez les souris APP/PS1** par rapport aux souris PS1 (hippocampe, striatum, corps calleux et cortex, privé de ses parties cingulaires et rétrospénales).

L'analyse qualitative de la répartition des *clusters* dans le cerveau de souris a par ailleurs mis en évidence que **certaines *clusters* pouvaient appartenir à plusieurs structures** (voir figures 4.7(a) (p. 136) et 4.8 (p. 137)). Pour étudier quantitativement ces localisations inter-structure des *clusters*, d'autres analyses ont été réalisées. La section suivante les décrit et les commente.

### 4.3 Analyse quantitative de la répartition des *clusters* dans le cerveau de souris

L'appartenance des *clusters* à plus d'une structure peut suggérer plusieurs hypothèses :

1. Il s'agit d'une conséquence d'éventuelles erreurs de recalage de l'atlas sur le *template* photographique.
2. Il s'agit d'une conséquence des inférences paramétrées dans SPMMouse : les paramètres choisis ont pu artificiellement regrouper plusieurs *clusters*. Cela suggère qu'il y aurait alors plus de zones où les souris APP/PS1 auraient un métabolisme différent des souris PS1.

#### 4.3.1 Taux de recouvrement des *clusters* et des segmentations de l'atlas

Pour évaluer quelles de ces hypothèses étaient vérifiées dans notre étude, nous nous sommes inspirés des travaux de Tzourio-Mazoyer et de Eickhoff (Tzourio-Mazoyer et al., 2002; Eickhoff et al., 2005). Comme décrit au début de la section précédente, ces équipes ont indexé les *clusters* résultant de leurs analyses statistiques en mesurant notamment le taux de recouvrement de ces *clusters* de pixels avec leurs segmentations. Nous avons donc calculé le recouvrement de chaque *cluster* résultant des analyses statistiques avec chacune des structures anatomiques segmentées.

Le [tableau 4.3](#) récapitule les taux de recouvrement entre les segmentations de l'atlas et les *clusters* résultant des analyses statistiques (et identifiés par la numérotation que nous leur avons donnée au [paragraphe 4.1.2.3](#) (p. 123)).

*Taux de recouvrement des clusters avec les segmentations de l'atlas (en %)*

<b>(a) Clusters représentant les zones de prise de glucose plus faible chez les souris APP/PS1 que chez les souris PS1</b>									
Segmentations de l'atlas	<i>n° et volume du cluster (mm<sup>3</sup>)</i>								
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
	<i>0,33</i>	<i>0,50</i>	<i>0,05</i>	<i>0,46</i>	<i>1,36</i>	<i>1,65</i>	<i>0,23</i>	<i>0,50</i>	<i>0,08</i>
Tronc cérébral	-	-	-	-	0,06	0,01	-	-	-
Cervelet	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-
Cortex cingulaire et rétrospénial	-	98,49	-	72,17	-	2,86	-	-	-
Reste du cortex	9,23	0,10	100	27,69	-	9,97	0,15	100	100
Corps calleux	1,42	1,41	-	0,14	-	0,02	1,69	-	-
Hippocampe	-	-	-	-	-	84,41	-	-	-
Colliculus inférieur	-	-	-	-	-	1,16	-	-	-
Capsule interne	-	-	-	-	-	-	0,60	-	-
Septum/Fimbria	-	-	-	-	-	-	1,83	-	-
Striatum	89,36	-	-	-	-	-	51,04	-	-
Colliculus supérieur	-	-	-	-	-	1,49	-	-	-
Thalamus	-	-	-	-	99,94	0,09	-	-	-
Ventricules	-	-	-	-	-	-	44,68	-	-

<b>(b) Clusters représentant les zones de prise de glucose plus élevée chez les souris APP/PS1 que chez les souris PS1</b>									
Segmentations de l'atlas	<i>n° et volume du cluster (mm<sup>3</sup>)</i>								
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	
	<i>0,06</i>	<i>0,29</i>	<i>0,18</i>	<i>0,17</i>	<i>0,33</i>	<i>0,07</i>	<i>0,39</i>	<i>0,13</i>	
Amygdale	-	0,24	5,13	-	-	-	-	73,41	
Commissure antérieure	-	-	-	5,37	-	-	-	-	
Corps calleux	-	0,71	-	-	25,17	20,26	-	-	
Reste du cortex	100	99,05	91,54	1,87	0,43	79,09	77,13	26,49	
Hippocampe	-	-	-	-	74,40	-	-	-	
Bulbe olfactif	-	-	-	45,43	-	-	-	-	
Striatum	-	-	3,33	47,33	-	0,65	22,87	0,10	

Tableau 4.3 – Taux de recouvrement (en %) des clusters sur les segmentations de l'atlas pour les contrastes représentant un hypo- (a) et un hypermétabolisme (b) chez les souris APP/PS1 ( $p < 0,01$  non corrigé pour les comparaisons multiples ; taille minimale des clusters = 1500 pixels). Les volumes des clusters sont indiqués en italique et exprimés en  $\text{mm}^3$ . Les taux obtenus montrent que certains clusters sont totalement inclus dans une seule région de l'atlas et que d'autres s'étalent sur plusieurs segmentations. Pour ces derniers, seules les sous-parties dont le volume est supérieur à  $0,05 \text{ mm}^3$  (critère retenu pour le modèle statistique) sont considérés probantes pour représenter une zone de variation du métabolisme entre les groupes de souris (surlignées en gris dans le tableau). Les ventricules ayant été soustraits de l'analyse statistique, le sous-cluster indexé dans cette région (a) a été fusionné avec la sous-partie du même cluster la plus proche, à savoir celle située dans le striatum.

Le [tableau 4.3](#) montre que sur les neuf *clusters* détectés pour le contraste "hypométabolisme chez les souris APP/PS1", trois (les *clusters* n° 3, 8 et 9) ont été intégralement contenus dans une seule structure cérébrale, celle nommée "reste du cortex". Sur les huit *clusters* détectés pour le contraste "hypermétabolisme chez les souris APP/PS1", un seul (le *cluster* n° 1) a été intégralement contenu dans une seule structure cérébrale ("reste du cortex").

Les cartes paramétriques résultant des analyses statistiques ont été seuillées de sorte à ne fournir que des *clusters* de pixels dont la taille minimale était  $0,05 \text{ mm}^3$ . Nous avons alors supposé que si un *cluster* était fractionné en **sous-clusters**, et que l'une de ces sous-parties avait un **volume inférieur à  $0,05 \text{ mm}^3$** , alors ce sous-*cluster* a été le **résultat d'erreurs de recalage et ne devait pas être considéré comme une zone de variation du métabolisme entre les groupes de souris**. Cela a par exemple été le cas du *cluster* n° 5 résultant du contraste "hypométabolisme chez les souris APP/PS1" : 99,94 % du *cluster* se trouvait dans le thalamus et seul 0,06 % dans le tronc cérébral. Ce *cluster* ayant un volume total  $\sim 1,36 \text{ mm}^3$  (cf. [tableau 4.3](#)), la partie incluse dans le tronc cérébral était largement inférieure à  $0,05 \text{ mm}^3$ . Suggérer que ce sous-*cluster* représentait une zone de variation du métabolisme entre les souris APP/PS1 et les souris PS1 n'était pas pertinent. Les *clusters* n° 1, 2 et 5 résultant du contraste "hypométabolisme chez les souris APP/PS1" ont ainsi pu être automatiquement et respectivement indexés dans le striatum, le cortex cingulaire et rétrospénial et dans le thalamus. Les *clusters* n° 2, 3 et 6 résultant du contraste "hypermétabolisme chez les souris APP/PS1" ont ainsi pu être automatiquement indexés dans la région nommée "reste du cortex". Le *cluster* n° 8 détecté pour ce contraste a lui été automatiquement indexé dans l'amygdale.

Le [tableau 4.3\(a\)](#) montre que près de 45 % du *cluster* n° 7 (soit  $\sim 0,10 \text{ mm}^3$ ) se situait dans les ventricules. Ces cavités ayant été soustraites des analyses statistiques (cf. [paragraphe 4.1.2 \(p. 121\)](#)), nous avons également supposé qu'il s'agissait d'une erreur de recalage de l'atlas sur le *template* photographique. Après vérification visuelle, nous avons considéré que la sous-partie du *cluster* n° 7 incluse, d'après notre analyse, dans les ventricules appartenait en réalité au striatum.

L'analyse des taux de recouvrement des *clusters* et des segmentations de l'atlas associée à celle des volumes des sous-*clusters* nous a permis d'identifier automatiquement, selon les segmentations de l'atlas, les zones de variation du métabolisme entre les groupes de souris dont la taille était significative (*i.e.*  $> 0,05 \text{ mm}^3$ ). Sur les neuf *clusters* détectés pour le contraste "hypométabolisme chez les souris APP/PS1", sept ont pu être automatiquement indexés dans des régions cérébrales. Sur les huit *clusters* détectés pour le contraste "hypermétabolisme chez les souris APP/PS1", cinq ont pu également être automatiquement indexés dans des structures du cerveau particulières. Pour plus de lisibilité, les zones retenues par ce précédent critère ont été surlignées en gris dans le [tableau 4.3](#).

Les figures 4.9(a) et (b) illustrent les *clusters* de pixels résultant des analyses statistiques et automatiquement indexés par les structures cérébrales définies dans l'atlas.

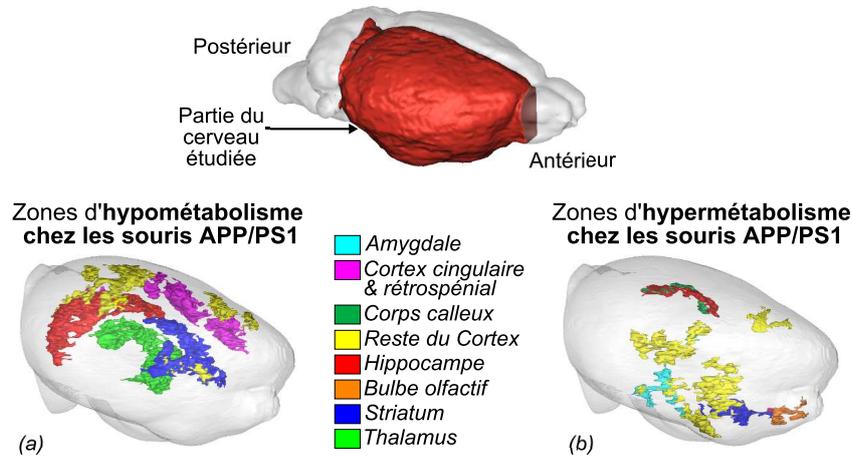


Figure 4.9 – Clusters de pixels résultant des analyses par comparaison statistique pour les contrastes représentant l'hypo- et l'hypermétabolisme chez les souris APP/PS1 ((a) et (b)) représentés en 3D, dans un rendu surfacique du template photographique, et indexés automatiquement dans des structures cérébrales selon le résultat du recalage de l'atlas sur le template photographique et l'analyse du taux de recouvrement des clusters dans les segmentations de l'atlas.

### 4.3.2 Analyse fonctionnelle dans les sous-*clusters* indexés par l'atlas

L'analyse de l'indexation automatique réalisée précédemment nous a permis d'identifier les *clusters* s'étalant sur plusieurs structures suite à des erreurs possibles de recalage.

Nous avons mesuré la prise de glucose moyenne dans chacun des sous-*clusters* restants (à savoir les *clusters* n° 4 et 6 pour le contraste "hypométabolisme chez les souris APP/PS1" et les *clusters* n° 4, 5 et 7 pour l'autre contraste), pondérée par l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les valeurs obtenues ont ensuite été comparées. Les pourcentages de différence des mesures d'activité entre les deux lignées transgéniques ont été calculés au sein de chaque sous-*cluster* indexé. Les résultats obtenus sont présentés dans le [tableau 4.4](#).

<i>n</i> <sup>o</sup> du <i>cluster</i>	Segmentations de l'atlas	Souris PS1 (n = 3) $\overline{\mu_{act}} \pm SEM$ (nCi/g)	Souris APP/PS1 (n = 4) $\overline{\mu_{act}} \pm SEM$ (nCi/g)	% de différence
<b>(a) Clusters représentant les zones de prise de glucose plus faible chez les souris APP/PS1 que chez les souris PS1</b>				
4	Cortex cing. et rétro.	318,87 ± 4,32	261,92 ± 1,14	-17,86
	Reste du cortex	326,16 ± 3,02	274,41 ± 1,93	-15,87
6	Cortex cing. et rétro.	311,03 ± 7,80	247,50 ± 5,13	-20,43
	Reste du cortex	310,38 ± 3,94	254,50 ± 3,48	-18,00
	Hippocampe	301,42 ± 3,21	239,33 ± 3,19	-20,60
<b>(b) Clusters représentant les zones de prise de glucose plus élevée chez les souris APP/PS1 que chez les souris PS1</b>				
4	Bulbe olfactif	217,98 ± 4,51	281,99 ± 3,17	+29,37
	Striatum	258,01 ± 0,73	307,11 ± 1,94	+19,03
5	Corps calleux	180,00 ± 4,21	229,67 ± 2,05	+27,60
	Hippocampe	194,54 ± 3,94	241,54 ± 2,43	+24,16
7	Reste du cortex	271,06 ± 7,63	344,79 ± 7,32	+27,20
	Striatum	275,53 ± 5,63	349,46 ± 6,37	+26,83

Tableau 4.4 – Activité moyenne par groupe ( $\overline{\mu_{act}}$ , en nCi/g), pondérée par l'erreur type de la moyenne (SEM), mesurée dans chacune des sous-parties des clusters résultant des deux contrastes de l'analyse statistique (hypo- (a) et hypermétabolisme (b) des souris APP/PS1) et appartenant à plusieurs structures. La colonne de droite montre les pourcentages de différence des mesures d'activité moyenne entre les deux groupes d'animaux. Les résultats obtenus pour les clusters n<sup>o</sup> 4 et 6 du 1<sup>er</sup> contraste et pour les clusters n<sup>o</sup> 4 et 5 du 2<sup>nd</sup> contraste suggèrent qu'il existait plusieurs foyers de variation du métabolisme au sein d'un unique cluster détecté par les analyses statistiques. Les résultats obtenus pour le cluster n<sup>o</sup> 7 du 2<sup>nd</sup> contraste suggèrent que cette zone de variation du métabolisme comportait un unique foyer situé dans la zone frontalière du striatum et du cortex cérébral.

Pour le contraste "hypométabolisme chez les souris APP/PS1" (tableau 4.4(a)) :

- *Activités des sous-parties du cluster n<sup>o</sup> 4.*

L'activité moyenne mesurée dans le sous-*cluster* indexé par la segmentation "cortex cingulaire et rétrospénial" est équivalente, chez les souris PS1, à celle mesurée dans le sous-*cluster* indexé par la segmentation "reste du cortex". En revanche, chez les souris APP/PS1, les deux valeurs sont plus éloignées. Le pourcentage de différence d'activité mesuré pour le sous-*cluster* indexé dans le cortex cingulaire et rétrospénial est plus important, de 2 points, que celui mesuré pour le sous-*cluster* indexé dans le reste du cortex. Cela peut suggérer qu'il existait deux foyers de variation du métabolisme distincts au sein du *cluster* n<sup>o</sup> 4 (un dans le cortex cingulaire et rétrospénial et un autre proche, mais indexé dans le reste du cortex).

- *Activités des sous-parties du cluster n° 6.*

Pour les deux groupes de souris, les activités moyennes mesurées dans le sous-*cluster* indexé par la segmentation "cortex cingulaire et rétrospénial" sont équivalentes à celles mesurées dans le sous-*cluster* indexé par la segmentation "reste du cortex". En revanche, ces valeurs sont en moyenne plus élevées que les activités mesurées, dans chacun des groupes, dans le sous-*cluster* indexé par la segmentation "hippocampe". Ces observations suggèrent qu'il existait, au sein du *cluster n° 6*, un foyer de variation du métabolisme dans l'hippocampe bien différent de ceux localisés dans le cortex cingulaire et rétrospénial et le reste du cortex.

Pour le contraste "hypermétabolisme chez les souris APP/PS1" (tableau 4.4(b)) :

- *Activités des sous-parties du cluster n° 4.*

Pour les deux groupes de souris, les activités moyennes mesurées dans le sous-*cluster* indexé par la segmentation "bulbe olfactif" sont plus faibles que celles mesurées dans le sous-*cluster* indexé dans le striatum. De plus, le pourcentage de différence d'activité mesuré dans le sous-*cluster* indexé dans le bulbe olfactif est de 10 points supérieur à celui mesuré pour le second sous-*cluster*. Ces observations suggèrent qu'il existait, au sein du *cluster n° 4*, un foyer de variation du métabolisme dans le bulbe olfactif et un autre dans le striatum.

- *Activités des sous-parties du cluster n° 5.*

Bien que les écarts soient moins importants en ce qui concerne les activités moyennes mesurées dans les sous-parties du *cluster n° 5*, nous avons aussi suggéré que ce *cluster* réunissait en réalité deux foyers distincts de variation du métabolisme entre les groupes de souris, un dans le corps calleux et un dans l'hippocampe.

- *Activités des sous-parties du cluster n° 7.*

Enfin, les activités moyennes mesurées dans les sous-parties de ce dernier *cluster* sont équivalentes entre elles. Ceci suggère que les deux sous-*clusters* indexés dans le striatum et le cortex délimitaient une zone de variation du métabolisme entre les souris APP/PS1 et les souris PS1 de même intensité.

### 4.3.3 Discussion de l'analyse quantitative de la répartition des *clusters* dans le cerveau de souris

Plusieurs hypothèses ont pu être émises suite à l'observation des *clusters* sur plusieurs structures :

1. Ce phénomène était dû à un recalage non optimisé, en tout point de l'espace, de l'atlas sur le *template* photographique ;
2. Les *clusters* détectés par les analyses statistiques regroupaient en réalité plusieurs foyers de variation du métabolisme répartis sur plusieurs structures anatomiques.

Pour éclaircir ces points, nous nous sommes inspirés des travaux de Tzourio-Mazoyer et de Eickhoff (Tzourio-Mazoyer et al., 2002; Eickhoff et al., 2005). Nous avons en effet calculé et analysé le taux de recouvrement des *clusters* sur les structures concernées. Cependant, nous ne nous sommes pas cantonnés à l'indexation "quantitative" des *clusters* dans les régions définies par l'atlas. Nous avons en plus mesuré l'activité contenue dans chacune des sous-parties des *clusters* indexées par l'atlas et nous avons comparé les résultats entre eux. L'ensemble des conclusions tirées par notre analyse a été vérifié visuellement par un expert.

#### 4.3.3.1 Analyse du taux de recouvrement des *clusters* et des segmentations de l'atlas

Le calcul du taux de recouvrement des *clusters* et des segmentations de l'atlas (cf. tableau 4.3 (p. 141)) nous a permis d'identifier les *clusters* résultant des analyses statistiques, intégralement circonscrits dans une seule structure cérébrale : sur les 17 *clusters* détectés (les deux contrastes confondus), 4 d'entre eux ont été détectés comme appartenant à une seule structure. Ces résultats ont également permis de lister tous les *clusters* s'étalant sur plusieurs structures et de calculer le volume de chaque sous-*cluster* indexé dans les structures définies par l'atlas. Les *clusters* de pixels retenus avaient, d'après les paramètres fixés pour nos tests, un volume minimal de  $0,05 \text{ mm}^3$ . Aussi, nous avons considéré que tous les sous-*clusters*, créés par l'indexation des *clusters* par l'atlas, dont le volume était inférieur à  $0,05 \text{ mm}^3$ , étaient la conséquence d'un recalage non optimal de l'atlas sur le *template* photographique en ces endroits et ne devaient pas être considérés comme des zones de variation du métabolisme entre les groupes de souris. Cette analyse nous a permis de réduire la liste des structures contenant des zones de variation du métabolisme entre les groupes (surlignées en gris dans le tableau 4.3). Notons également que pour le contraste représentant l'hypométabolisme chez les souris APP/PS1, le sous-*cluster* détecté dans les ventricules a aussi été considéré comme une conséquence d'erreurs de recalage d'un atlas créé à partir de données acquises *in situ* sur une image moyenne de données

*post mortem* acquises *ex situ*. Cette analyse a permis d'indexer automatiquement dans des régions cérébrales 8 *clusters* parmi les 13 restants.

#### 4.3.3.2 Analyse fonctionnelle dans les sous-*clusters* indexés par l'atlas

Pour définir, parmi les *clusters* ayant des sous-parties de taille significative réparties sur plusieurs structures (5 *clusters* au total), ceux réunissant plusieurs foyers de variation du métabolisme, nous avons mesuré l'activité contenue dans chacun de ces sous-*clusters* et calculé à nouveau le pourcentage de différence des mesures d'activité entre les deux lignées transgéniques au sein de chaque sous-*cluster* indexé. Les résultats de cette analyse ont été présentés dans le [tableau 4.4](#) (p. 144).

##### *Foyers de variation du métabolisme entre les groupes de souris*

Cette analyse fonctionnelle nous a permis de suggérer l'existence de plusieurs foyers de variation du métabolisme au sein des *clusters* n° 4 et 6, résultant du contraste "hypométabolisme chez les souris APP/PS1" et des *clusters* n° 4, 5 et 7, résultant du contraste "hypermétabolisme chez les souris APP/PS1". La combinaison des approches d'analyse par atlas et par comparaison statistique des intensités des pixels des images a donc permis d'identifier au total 12 zones cérébrales dans lesquelles la prise de glucose était moindre chez des souris APP/PS1 que chez des souris PS1, et 11 zones dans lesquelles cette prise était plus élevée chez les souris modélisant la maladie d'Alzheimer que chez leurs contrôles. Ce découpage automatique de *cluster*, difficilement réalisable manuellement, a par ailleurs permis d'identifier des zones où la différence d'activité entre les deux groupes de souris était plus importante que celle calculée pour les *clusters* non subdivisés (se reporter aux résultats exposés dans les [tableaux 4.1](#) (p. 125) et [4.4](#) (p. 144)). Le pourcentage de différence d'activité entre les deux groupes calculé dans le *cluster* n° 4 résultant du contraste "hypermétabolisme chez les souris APP/PS1" était par exemple de +23,60 % ; celui calculé pour la sous-partie de ce *cluster* indexée dans le bulbe olfactif était de +29,37 %.

##### *Hypermétabolisme détecté dans le corps calleux des souris APP/PS1*

Cette analyse semble confirmer une prise de glucose plus élevée dans la matière blanche (dans le corps calleux) des souris APP/PS1 que des souris PS1 (+27,60 %). Le corps calleux étant une structure très fine, il peut être difficilement détectable sur le *template* photographique, créé après plusieurs lissages et normalisations spatiales d'images. Si nous considérons que la stratégie de recalage utilisée pour mettre en correspondance l'atlas sur ce *template* était menée par les structures de taille importante (cf. [paragraphe 3.2.3.1](#) (p. 100)), nous pouvons suggérer que la détection d'une variation du métabolisme dans cette structure

était due à un recalage non optimal dans cette région. Cette hypothèse est étayée par les faibles scores des critères de superposition obtenus pour cette structure (index de Dice inférieurs à 0,70, voir [tableau 4.2](#) (p. 134)).

Cependant, d'autres interprétations de ces résultats peuvent être envisagées. Cette prise de glucose dans le corps calleux plus importante chez les souris modélisant la maladie d'Alzheimer que chez leurs contrôles peut refléter une atrophie de cette structure soulignée par des études sur la morphologie cérébrale de souris modélisant cette pathologie ([Redwine et al., 2003](#); [Valla et al., 2006](#); [Lau et al., 2008b](#); [Maheswaran et al., 2009b](#)) ou encore un effet de volume partiel présent dans les autoradiographies ([Valla et al., 2002](#)). Dans ces cas là, l'activité mesurée serait en réalité contenue dans une structure voisine du corps calleux.

Enfin, l'hypermétabolisme détecté dans la matière blanche peut également suggérer une compensation du dysfonctionnement de la matière blanche observée notamment chez d'autres souris transgéniques modélisant cette maladie ([Desai et al., 2009](#)) ou celle d'un défaut de communication entre les deux hémisphères ([Vyazovskiy et al., 2008](#)).

#### *Hypermétabolisme détecté dans le bulbe olfactif des souris APP/PS1*

L'indexation et l'analyse fonctionnelle par atlas des *clusters* résultant du contraste "hypermétabolisme chez les souris APP/PS1" ont mis en évidence et confirmé une zone de variation du métabolisme significative entre les groupes de souris au niveau du bulbe olfactif (+29,37 % de 2DG détectés dans cette structure chez les souris APP/PS1 par rapport aux souris PS1). Ce résultat montre en premier lieu que cette structure comportait une partie sous-corticale non extraite durant le traitement des tissus (voir [section 2.2](#) (p. 71)). La prise de glucose plus importante chez les souris modélisant la maladie d'Alzheimer par rapport à leurs contrôles peut suggérer des effets compensatoires développés par ce type de souris et observés dans leur système olfactif ([Wesson et al., 2010](#)).

#### *Hypermétabolisme détecté dans l'amygdale des souris APP/PS1*

L'hyperactivité détectée dans l'amygdale des souris APP/PS1 (+18,03 % de prise de glucose chez ces souris) peut quant à elle être corrélée avec les altérations morphologiques de cette structure ([Knafo et al., 2009](#)).

La littérature citée ci-dessus suggère qu'il faut tenir compte des hypermétabolismes détectés dans le corps calleux, le bulbe olfactif et l'amygdale. **Ces hyperactivités, difficilement détectables manuellement**, *i.e.* en superposant les cartes paramétriques seuillées sur des images histologiques et en identifiant la localisation des *clusters* avec un atlas papier comme cela a été réalisé dans l'étude [Dubois et al. \(2010b\)](#), **illustrent bien les apports de la combinaison des approches d'analyse par atlas et par comparaison statistique des intensités des pixels des images :**

1. tout *cluster* résultant d'une analyse statistique peut être automatiquement indexé dans une région définie dans un atlas ;
2. si ce dernier s'étend sur plus d'une structure, l'atlas peut différencier automatiquement les sous-parties de ce *cluster* indexées dans des régions différentes. L'analyse des volumes et activités circonscrites dans chaque sous-*cluster* permet de raffiner l'interprétation des résultats et de les corroborer avec ceux obtenus dans d'autres études.

## 4.4 Utilisation de l'atlas pour restreindre le nombre de tests statistiques effectués

Les résultats de notre étude ont été obtenus en effectuant un test statistique dont le seuil de significativité a été fixé à 0,01 non corrigé pour les comparaisons multiples. Compte tenu de ce paramètre, le contraste représentant l'hypométabolisme chez les souris APP/PS1 a détecté plus de  $160.10^3$  pixels positifs au test statistique (regroupés par paquet de 1500 pixels minimum). Pour diminuer le nombre de faux positifs détectés, Genovese *et al.* ont proposé d'appliquer la correction du FDR sur des sous-parties isolées afin d'écartier tous les tests dont le résultat peut être connu par de précédentes hypothèses (Genovese *et al.*, 2002).

Cette approche a déjà été réalisée dans le cadre d'études cliniques. Maldjian et ses collègues ont par exemple proposé de limiter les analyses de données IRMf dans des segmentations de régions cérébrales, créées dans le référentiel du MNI et à partir des coordonnées de Talairach (Maldjian *et al.*, 2003). Pour permettre à d'autres équipes d'utiliser ces segmentations une boîte à outil de SPM (*pickatlas*) a été développée et distribuée par cette équipe. De leur côté, Eickhoff et ses collaborateurs ont utilisé des atlas paramétriques définis dans Eickhoff *et al.* (2005) pour restreindre leur analyse d'images IRMf (Eickhoff *et al.*, 2006). Ils ont par la suite estimé leurs résultats statistiques avec un seuil de significativité fixé à 0,05 en appliquant la correction nommée *Family Wise Error* (Worsley *et al.*, 1996). Dernièrement, Mevel *et al.* ont étudié des images TEP en restreignant leur analyse dans la région de l'hippocampe, délimitée manuellement (Mével *et al.*, 2007). Comme pour l'étude précédemment décrite, leurs résultats statistiques ont été estimés avec un seuil de significativité fixé à 0,05 en appliquant la même correction statistique.

Dans le cadre d'études sur le Rongeur, Dubois *et al.* ont segmenté manuellement des régions d'intérêt sur le *template* créé pour leur étude statistique (Dubois *et al.*, 2008b). Ils sont parvenus à estimer leurs résultats statistiques avec un seuil de significativité fixé à 0,05 en appliquant la correction statistique du FDR, correction moins conservative que celle citée précédemment. Pour s'affranchir des segmentations manuelles, cette équipe, comme celle de Maheswaran, a proposé d'utiliser les segmentations d'un atlas pour corriger les résultats obtenus avec l'analyse par comparaison statistique des intensités des pixels d'images (Maheswaran *et al.*, 2009a; Dubois *et al.*, 2010b). A notre connaissance, l'utilisation de segmentations d'atlas pour restreindre le nombre de tests effectués dans une telle analyse réalisée sur des images de rongeurs n'a pas encore été mise en œuvre. Ayant auparavant normalisé notre atlas de cerveau de souris dans le référentiel du *template* créé pour une analyse par comparaison statistique, **nous avons proposé d'utiliser les segmentations de cet atlas** non plus pour seulement analyser spatialement les *clusters* résultant des analyses statistiques, mais également **pour restreindre le nombre de tests effectués en vue de fournir des résultats statistiques corrigés.**

### 4.4.1 Nouveau modèle statistique

Le modèle statistique paramétré dans SPMouse pour cette partie de l'étude s'est appuyé sur celui utilisé précédemment (voir [paragraphe 4.1.2 \(p. 71\)](#)). Cependant, pour restreindre le nombre de tests effectués, **nous avons masqué les autoradiographies à analyser par les segmentations de l'atlas recalé sur le *template* photographique.**

L'étude précédente nous a permis de lister les parties des images susceptibles de présenter des différences significatives entre les groupes de l'étude (voir les zones surlignées en gris dans le [tableau 4.3 \(p. 141\)](#)) :

- pour le contraste représentant les zones de prise de glucose plus faible chez les souris APP/PS1 que chez les souris PS1, nous avons limité les tests en masquant successivement les données fonctionnelles avec les segmentations du cortex cingulaire et rétrospénial ( $\sim 99.10^3$  pixels), du reste du cortex ( $\sim 922.10^3$  pixels), de l'hippocampe ( $\sim 167.10^3$  pixels), du striatum (fusionné avec les ventricules soit  $\sim 217.10^3$  pixels) et du thalamus ( $\sim 223.10^3$  pixels) ;
- pour le contraste représentant les zones de prise de glucose plus élevée chez les souris APP/PS1 que chez les souris PS1, nous avons limité les tests en masquant successivement les données fonctionnelles avec les segmentations de l'amygdale ( $\sim 84.10^3$  pixels), du corps calleux ( $\sim 82.10^3$  pixels), du reste du cortex ( $\sim 922.10^3$  pixels), de l'hippocampe ( $\sim 167.10^3$  pixels), du bulbe olfactif ( $\sim 76.10^3$  pixels) et du striatum ( $\sim 184.10^3$  pixels).

L'application de chacune de ces segmentations a permis de réduire d'un facteur 10, voire 100, le nombre de pixels testés.

Ayant peu d'animaux dans nos groupes, nous avons corrigé les tests en utilisant le FDR paramétré dans SPM : le seuil de significativité des tests a été fixé à 0,05 et aucune contrainte concernant la taille minimale des *clusters* n'a été imposée. Tout *cluster* ayant une *p*-value inférieure à 0,05 a donc été détecté.

### 4.4.2 Résultats de cette nouvelle analyse statistique

Sur l'ensemble des tests précédemment décrits, seule l'application du masque de l'**hippocampe** et pour le contraste représentant les zones de **prise de glucose plus faible chez les souris APP/PS1** que chez les souris PS1 a permis de détecter une zone de différence fonctionnelle significative entre les deux groupes ( $p < 0,05$  corrigé pour les comparaisons multiples, sans taille minimale de *clusters*). Le pourcentage de différence d'activité entre les deux lignées de souris dans ce *cluster* a été estimé à environ -22,39 %, soit près de 2 points supérieur (en valeur absolue) à celui estimé dans le sous-*cluster* indexé dans l'hippocampe (voir [tableau 4.4 \(p. 144\)](#)).

La figure 4.10 illustre les *clusters* indexés dans l'hippocampe obtenus avec (rouge foncé) et sans (rouge pâle) correction pour les comparaisons multiples. Le *cluster* obtenu après correction FDR a un volume  $\sim 0,74\text{mm}^3$ ; celui obtenu précédemment avait un volume  $\sim 1,39\text{mm}^3$ .

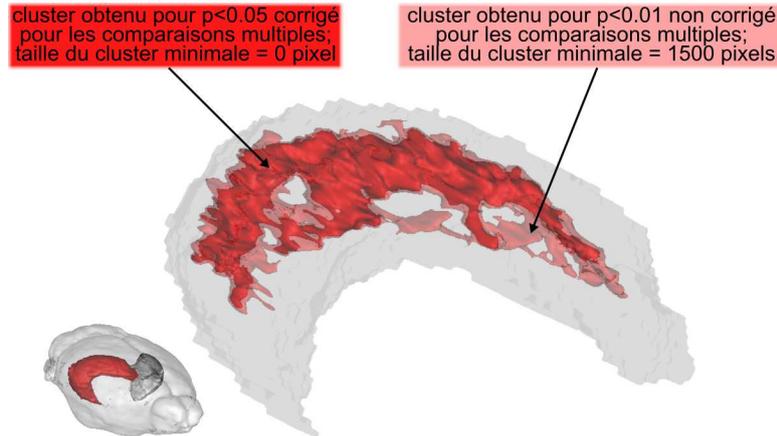


Figure 4.10 – Représentation 3D des clusters de pixels représentant un hypométabolisme chez les souris APP/PS1 dans la région de l'hippocampe, obtenus avec (rouge foncé) et sans (rouge pâle) correction pour les comparaisons multiples. La restriction de l'analyse statistique par la segmentation de l'hippocampe a permis d'obtenir une zone ( $\sim 0,74\text{mm}^3$ ) dont le pourcentage de différence d'activité entre les groupes est de  $\sim -22,39\%$ , soit plus important que celui obtenu sans correction statistique ( $\sim -20,60\%$  de différence d'activité mesurée dans  $\sim 1,39\text{mm}^3$ ).

### 4.4.3 Discussion de la méthode de correction de tests statistiques par atlas

Les données fonctionnelles de notre étude correspondaient à plus de  $5 \cdot 10^6$  pixels (fond de l'image exclu). Lorsque nous avons pris en compte l'intégralité de ces données, l'analyse par comparaison statistique des intensités des images considérant un seuil de significativité statistique fixé à 0,01 a pu détecter plusieurs milliers de faux positifs. Par ailleurs, la correction FDR n'a pas pu être appliquée sur l'intégralité de ces images.

En utilisant les segmentations de l'atlas recalé sur le *template* photographique, nous avons pu réduire considérablement le nombre de pixels testés (entre un facteur 10 et 100). Les tests réalisés dans l'hippocampe ont pu par la suite être corrigés par l'application du FDR dans le modèle statistique (avec un seuil de significativité fixé à 0,05). Le pourcentage de différence d'activité entre les deux lignées de souris dans le *cluster* résultant de cette analyse s'est révélé plus élevé que celui estimé sans la correction FDR. L'obtention d'un tel résultat confirme que **superviser une analyse statistique par un atlas peut raffiner les résultats**. En effet, grâce à cette seconde analyse, nous avons pu confirmer que les souris APP/PS1 consommaient moins de glucose que les souris PS1 dans la région de

l'hippocampe. A notre connaissance, **ces travaux sont les premiers à montrer qu'il est possible d'obtenir des résultats statistiquement significatifs sur des volumes autoradiographiques de cerveaux de rongeurs en restreignant l'analyse statistique réalisée par les segmentations d'un atlas préalablement recalés sur les données étudiées.**

L'analyse statistique, restreinte à certaines sous-parties des images natives, n'a fourni de résultats qu'avec la segmentation de l'hippocampe. L'absence de résultats pour les autres masques appliqués peut être dû à la forme des segmentations (Frackowiak et al., 2003), ou bien au pourcentage d'occupation du *cluster* (obtenu sans correction) dans la région segmentée. En effet, le volume du sous-*cluster* résultant du contraste "hypométabolisme chez les souris APP/PS1" de la première étude et indexé dans l'hippocampe valait près de 12% du volume de l'hippocampe. Il s'agissait du seul (sous-)*cluster* occupant plus de 10% de la région dans laquelle il était indexé. Ces observations suggèrent qu'il peut exister une relation entre la possible correction statistique des comparaisons multiples par des segmentations et la proportion du volume du *cluster* à détecter par rapport à celui du masque restreignant le nombre de pixels testés. Des tests supplémentaires pourraient être réalisés sur un autre jeu de données pour confirmer ou non cette hypothèse, voire pour définir la proportion minimale d'occupation d'un *cluster* dans une région pour que la correction statistique des comparaisons multiples puisse fournir des résultats fiables. Notons que les filtres appliqués pour lisser les données peuvent également avoir une influence sur la taille des *clusters* obtenus (Frackowiak et al., 2003). Des tests pourraient donc aussi être réalisés pour évaluer leur impact sur les résultats.

## 4.5 Bilan de la combinaison d'approches d'analyse de données *post mortem* et valorisation des travaux

Pour indexer et analyser automatiquement les *clusters* résultant d'analyses par comparaison statistique des intensités des pixels d'images dans les structures cérébrales de souris, nous nous sommes inspirés de travaux déjà réalisés dans le cadre d'études cliniques. A notre connaissance, un tel travail n'a pas encore été mis en œuvre pour des études sur le Rongeur. Pour ce faire, nous avons proposé de recalculer automatiquement, selon la stratégie proposée en [chapitre 3](#) (p. 78) un atlas numérique 3D sur le *template* spécifiquement créé pour l'analyse statistique. Les **travaux** présentés et commentés dans ce chapitre ont été **valorisés** lors de la **conférence internationale** de 2010 de l'IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC) ([Lebenberg et al., 2010b](#)). Une **description plus approfondie** de ces travaux est actuellement **en cours d'écriture** pour une revue scientifique.

**L'utilisation des segmentations de l'atlas pour localiser les différences métaboliques** détectées entre les groupes de souris a l'avantage non négligeable de **lister rapidement l'ensemble des structures cérébrales mises en jeu** par le phénomène étudié. Ces résultats ont été obtenus automatiquement et sans avoir eu à se référer à un atlas papier. Cette approche a donc réduit et **facilité l'intervention d'un expert** en neuroanatomie pour analyser les résultats. **Nous avons par exemple pu constater rapidement de l'hypo- et de l'hypermétabolisme des souris APP/PS1** par rapport aux souris PS1 situées dans les **mêmes structures cérébrales** (hippocampe, striatum et cortex). Nous avons également pu identifier plusieurs foyers de variation du métabolisme entre les groupes au sein d'un même *cluster* résultant des analyses statistiques. Ces foyers, non identifiables en exploitant uniquement les analyses statistiques, ont été discernés grâce à la subdivision par l'atlas des *clusters* s'étendant sur plusieurs régions segmentées.

Nos travaux ont par ailleurs montré que superviser les résultats d'une analyse statistique avec un atlas pouvait permettre d'**identifier des structures potentiellement impliquées dans la maladie d'Alzheimer** (exemples du bulbe olfactif et du corps calleux). Ces **observations, difficilement concluantes par une analyse visuelle** des projections des *clusters* sur des coupes histologiques, n'ont pas pu être mises en évidence dans l'étude [Dubois et al. \(2010b\)](#) menée en parallèle de ces travaux. Dubois *et al.* ont en revanche pu, grâce à un atlas papier, localiser plus précisément certains *clusters* corticaux. Alors que nous ne pouvions indexer ces *clusters* soit dans le cortex cingulaire et rétrosplénial, soit dans le reste du cortex, cette équipe a par exemple pu différencier la partie cingulaire de la partie rétrospléniale du cortex et identifier la partie somatosensorielle du cortex. Les résultats d'indexation automatique par atlas des *clusters* dans des régions cérébrales dépendent donc de l'échelle des segmentations de l'atlas.

L’analyse par atlas de la répartition des *clusters* dans le cerveau peut donc se révéler peu probante pour des projets visant à étudier une région d’intérêt unique (suite à une stimulation auditive ou motrice par exemple). En revanche, pour des études analysant le comportement des sujets après diverses stimulations ou pour des études préliminaires exploratoires d’une pathologie particulière, de nombreux *clusters*, de taille variable, représentant les différences entre les groupes peuvent être détectés des analyses statistiques. Dans ces cas-ci, superviser ces analyses statistiques par un atlas présente un gain de temps considérable. En plus de les indexer rapidement dans des structures cérébrales et évaluer le volume de chaque sous-*cluster* automatiquement défini par l’atlas, nous pourrions également analyser leur éventuelle **répartition symétrique dans le cerveau** si la base de données de l’étude est constituée de cerveaux entiers. Le plan inter-hémisphérique de l’atlas correspondant à l’axe  $x = \text{dim}X/2$ , où  $\text{dim}X$  est la dimension en  $x$  de l’image, nous pouvons aisément différencier les segmentations de l’atlas appartenant à l’un et l’autre hémisphère (cf. figure 4.11). Le gain de temps obtenu sur la localisation des *clusters* pourrait nous permettre d’envisager de tester un grand nombre d’hypothèses modélisées par plusieurs modèles statistiques (différents seuils de significativité, tailles minimales des *clusters*), comparer les résultats et approfondir les études.

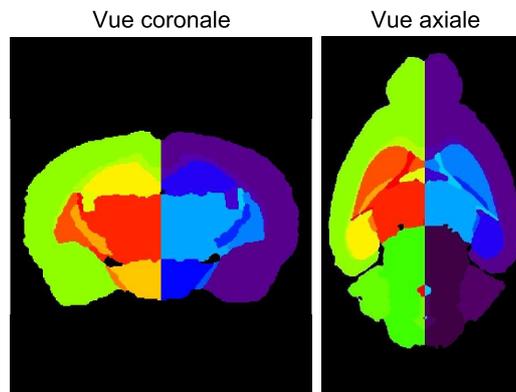


Figure 4.11 – Atlas numérique du cerveau entier de souris dont les segmentations appartenant à l’un et l’autre hémisphère ont été différenciées.

Superviser les résultats d’analyses statistiques par un atlas est donc une **approche prometteuse** pour étudier de nombreuses images acquises *post mortem* mais également *in vivo*. Les études de Lau, Maheswaran et Sawiak (Lau et al., 2008b; Maheswaran et al., 2009a; Sawiak et al., 2009) par exemple pourraient bénéficier des avantages résultant de la combinaison de ces approches d’analyse.

Pour raffiner davantage la localisation des *clusters* dans le cerveau de souris, nous pourrions coupler les informations de leur appartenance à des structures cérébrales à une position relative par rapport aux points bregma et lambda définis sur la boîte crânienne des animaux (Aggarwal et al., 2009). Ce couplage d’informations profiterait aux biologistes, habitués à se repérer avec de telles coordonnées dans les atlas papier. Cependant, cela impose l’acquisition d’images de la boîte crânienne des animaux sur lesquelles l’atlas pourrait être recalé.

La supervision de l'analyse statistique à l'échelle du pixel réalisée via le logiciel SPMMouse par les segmentations de l'atlas numérique nous a permis d'améliorer les résultats obtenus : le temps consacré à identifier les clusters de pixels activés par l'analyse SPMMouse a pu être optimisé et le nombre de comparaisons statistiques réalisées a pu être automatiquement restreint grâce aux segmentations de l'atlas, rendant ainsi les tests statistiquement plus significatifs (la correction dite "False Discovery Rate" a pu être appliquée). En combinant ces deux approches d'analyse, nous avons pu tirer profit des avantages de chacune et ainsi repousser leurs limitations d'utilisation (voir figure 4.12). Cette stratégie d'analyse devrait confirmer sa grande efficacité et son utilité sur un jeu de données plus complexe (étude réalisée sur cerveaux entiers, nombre plus important de zones de variations métaboliques et d'animaux).

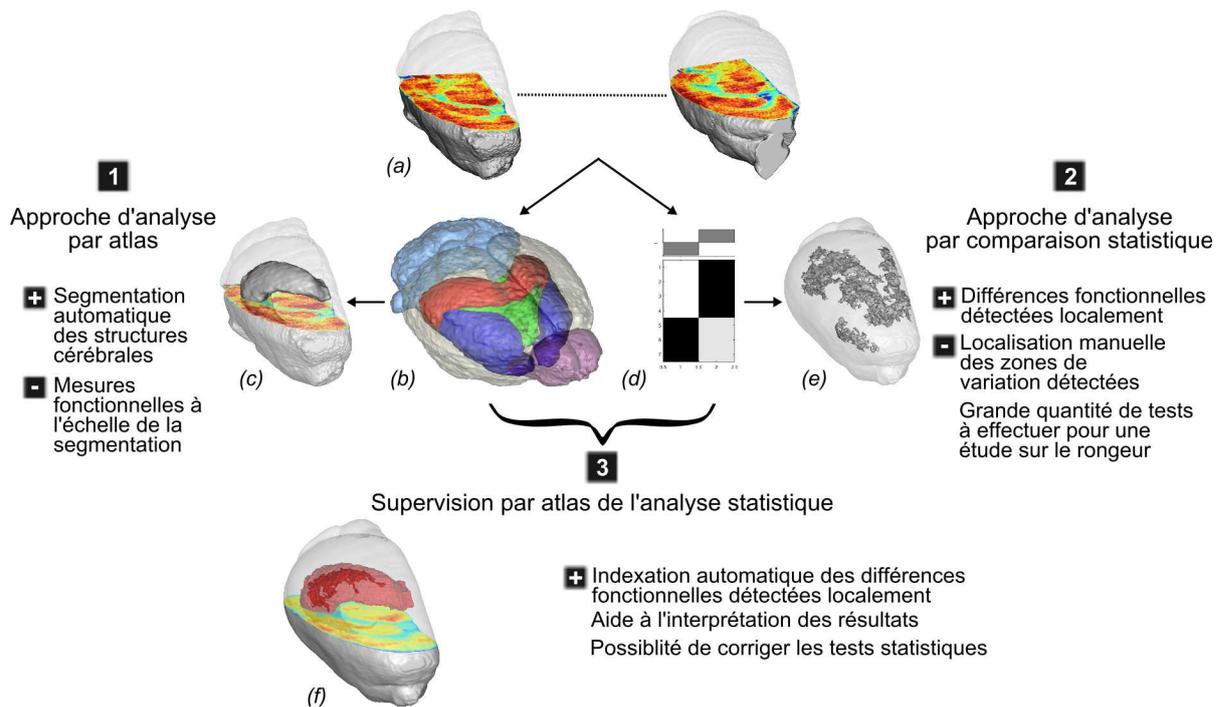


Figure 4.12 – Apports de la combinaison d'approches d'analyse de volumes autoradiographiques (a) par un atlas numérique (b) (méthode 1) avec celle par comparaison statistique des intensités des images (d) (méthode 2). La méthode 1 a permis d'identifier automatiquement des structures cérébrales dans un image fonctionnelle 3D mais de ne mesurer les informations qu'à l'échelle des segmentations (c). La méthode 2 a permis de mettre en évidence des différences fonctionnelles locales mais leur localisation dans des structures cérébrales reste une tâche laborieuse (e). La supervision de l'analyse statistique par l'atlas (méthode 3) a permis de tirer profit des avantages des deux premières méthodes (f).

# Chapitre 5

## Utilisation de l'atlas numérique 3D de cerveau de souris pour l'analyse de données acquises *in vivo*

Les méthodes et résultats présentés dans les chapitres 3 et 4 ont permis de prouver la faisabilité d'une analyse automatisée et optimisée de cerveaux de souris grâce à l'utilisation d'un atlas numérique 3D. L'atlas fourni par le CIVM a permis d'étudier des données post mortem (histologiques et autoradiographiques) de souris modélisant un aspect de la maladie d'Alzheimer ainsi que leurs contrôles. Ceci étend les domaines d'application de l'atlas initialement développés pour analyser des données IRM acquises *in vivo* sur d'autres lignées de souris transgéniques (Badea et al., 2007, 2009). Dans ce dernier chapitre, nous étudions la possibilité d'utiliser cet atlas pour guider l'analyse de données TEP et TDM acquises *in vivo* en vue d'une étude s'intéressant plus généralement à la neuroinflammation sur des modèles de souris. Cette approche, bien que préliminaire et limitée à un examen, constitue une perspective très prometteuse du travail présenté. Le contexte et les données de cette étude, suivis de la nouvelle stratégie de recalage proposée pour faire correspondre l'atlas avec les volumes TEP et TDM sont présentés et discutés. La figure 5.1 présente une synthèse de l'organisation de ce chapitre ainsi que des principaux points abordés.

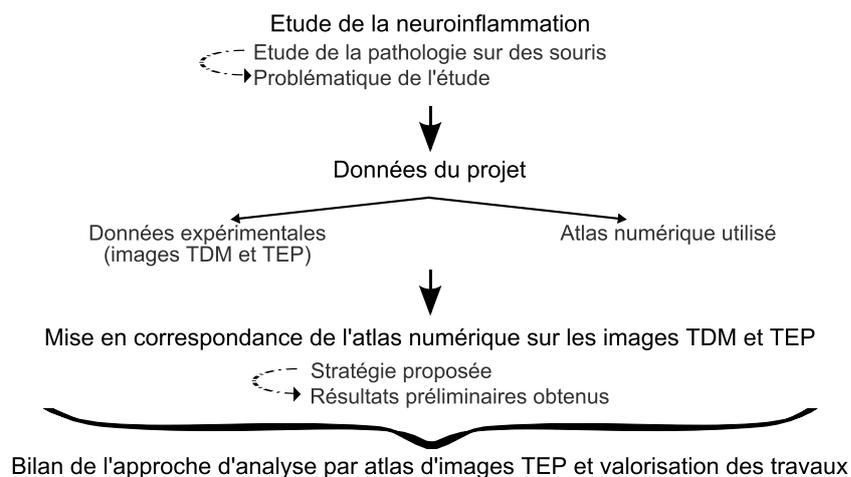


Figure 5.1 – Organisation du chapitre 5 de ce manuscrit et principaux points abordés.

## 5.1 Contexte de l'étude sur la neuroinflammation

La recherche préliminaire présentée dans ce chapitre a été réalisée dans le cadre d'une collaboration entre l'ANSTO (*Australian Nuclear Science and Technology Organisation*) et l'équipe de traitement d'images de MIRCen. Ce projet a été initié en fin de thèse et avait pour objectif d'utiliser un atlas numérique de cerveau de souris pour l'analyse de données TEP (Tomographie par Emission de Positons) dans une étude sur un traceur de la neuroinflammation. L'étude de ce processus sur des modèles de maladies neurodégénératives est d'un grand intérêt car il constitue un aspect important dans l'évolution de ces maladies.

### 5.1.1 Etude de la neuroinflammation sur la Souris

La neuroinflammation se manifeste en partie dans les cellules microgliales. Ces cellules représentent 5 à 20% de la population gliale<sup>a</sup> totale. Elles appartiennent à la lignée des macrophages, cellules capables de phagocytose des cellules mortes et des corps étrangers. Elles forment ainsi la principale défense immunitaire active du système nerveux central. Lors d'une lésion neuronale, des substances chimiques, les chemokines, vont être libérées et attirer les cellules microgliales. Ces dernières passeront de l'état passif à l'état actif : leur forme va changer (d'un aspect étoilé avec ramifications à un aspect améboïde<sup>b</sup> avec disparition des prolongements), les cellules vont proliférer et des facteurs solubles neurotoxiques vont être libérés (cf. [figure 5.2](#)). Ces facteurs proapoptotiques et proinflammatoires vont favoriser la mort cellulaire (les neurones dans le cas présent). Les cellules microgliales participeraient donc à l'apparition de nombreuses maladies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la sclérose en plaque par exemple.

Étant de petites tailles, elles sont difficilement repérables dans le cerveau. Cependant, elles peuvent être marquées par des radioligands spécifiques au récepteur périphérique des benzodiazépines (*Peripheral Benzodiazepine Receptor* (PBR) en anglais) qui ont une perfusion limitée dans le cerveau ([Banati, 2002](#)). L'acquisition d'images TEP peut ainsi permettre un suivi longitudinal de l'inflammation neuronale chez un sujet voire l'étude d'effet de thérapeutiques.

---

a. Les cellules gliales se situent dans le système nerveux.

b. Un amibe est un animal unicellulaire, vivant dans l'eau douce ou salée, muni de pseudopodes (parties servant à la locomotion).

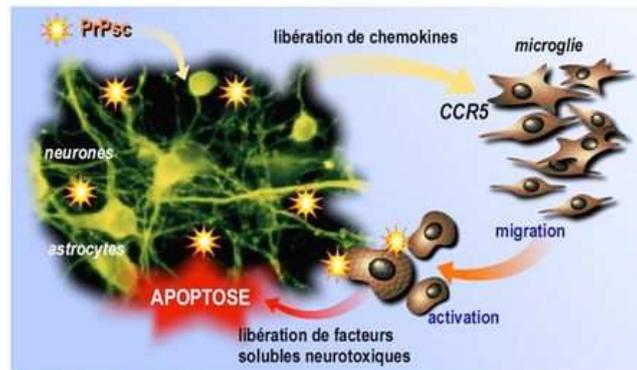


Figure 5.2 – Activation des cellules microgliales suite à une lésion neuronale. Lors d'une lésion neuronale (représentée ici par le dépôt du prion PrPsc (pour Protéine P scrapie), des substances chimiques (chemokines) vont être libérées et peuvent activer des cellules microgliales via des récepteurs membranaires (exemple ici du récepteur CCR5). Une fois activées, ces cellules vont changer de forme et libérer des facteurs solubles neurotoxiques favorisant la mort cellulaire (apoptose). Source : <http://www.123bio.net/>.

### 5.1.2 Problématique de l'étude

Des systèmes d'acquisition d'images TEP dédiés à l'imagerie du petit animal et notamment de la Souris sont disponibles depuis quelques années. Les images produites par ces systèmes présentent une résolution spatiale de l'ordre du millimètre. Il est important d'acquérir en parallèle des images anatomiques.

Des systèmes hybrides combinant les technologies de la TDM (TomoDensitoMétrie) et de la TEP sont actuellement commercialisés. Ils fournissent des images anatomiques (TDM, image de la structure osseuse) directement mises en correspondance avec des images fonctionnelles (TEP, image de la fixation d'un radioligand). Néanmoins, la technologie TDM ne permet pas de différencier des tissus situés à l'intérieur de compartiments osseux, tels que le cerveau (voir paragraphe 1.2.2.1 (p. 16)).

L'objectif de ce travail a donc été de **développer une méthode permettant d'extraire les informations contenues dans les structures internes du cerveau** (cortex, striatum, hippocampe, thalamus, ...) dans des examens TEP. Pour cela, nous avons proposé de **recaler un atlas numérique sur les images TDM et TEP** à analyser.

## 5.2 Données de l'étude

### 5.2.1 Données TEP et TDM

#### 5.2.1.1 Acquisition des images

Pour étudier la neuroinflammation, l'équipe de l'ANSTO a acquis des images (corps entier) TDM et TEP sur des souris contrôles et pathologiques. Plusieurs campagnes d'acquisition ont été réalisées sur une période de huit semaines afin d'étudier l'évolution de la pathologie. Un même radiotracer spécifique au PBR a été injecté et imagé. Le système Inveon de chez Siemens a été utilisé pour ce projet. Ses caractéristiques sont présentées dans (Kemp et al., 2009).

Dans le cadre de cette étude préliminaire, des données TEP et TDM acquises à deux temps sur une souris contrôle ont été étudiées. Avant chaque acquisition, 0,06 nmol du radiotracer spécifique au PBR a été injecté chez la souris. Après 45 min, une image TEP a été réalisée en 10 minutes suivie de l'acquisition d'une image TDM. L'image fonctionnelle a été reconstruite par un algorithme *Ordered Subsets Expectation Maximization/Maximum A Posteriori* (OSEM/MAP) (Hudson and Larkin, 1994; Cho et al., 2007) dans une matrice de  $128 \times 128 \times 159$  pixels avec une taille de pixels valant  $0,287 \times 0,287 \times 0,796$  mm<sup>3</sup>. L'image TDM a été reconstruite à partir de 200 projections dans une matrice de  $256 \times 256 \times 512$  pixels avec une résolution isotrope de 0,217 mm.

Des illustrations des images TDM et TEP acquises au temps 1 se trouvent respectivement en figures 5.3(a) et (b).

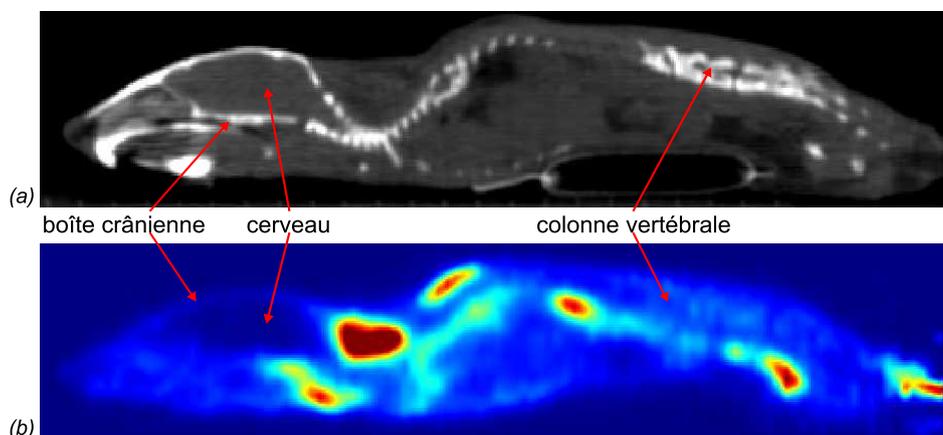


Figure 5.3 – Vues sagittales des images TDM (a) et TEP (b) acquises sur une souris contrôle corps entier.

### 5.2.1.2 Pré-traitements des données TEP et TDM

Les images TDM et TEP corps entier ont été acquises. Un sous-volume comprenant uniquement le cerveau a ensuite été extrait interactivement sur l'examen TDM grâce aux logiciels Anatomist et BrainVISA (cf. figure 5.4(a)). Le champ de vue équivalent a été extrait de l'image TEP (cf. figure 5.4(b)). Ces images ayant été acquises sur une souris contrôle, le radiotraceur spécifique au PBR s'est peu fixé aux cellules cérébrales de l'animal. La fusion des images anatomique et fonctionnelle est illustrée en figure 5.4(c).

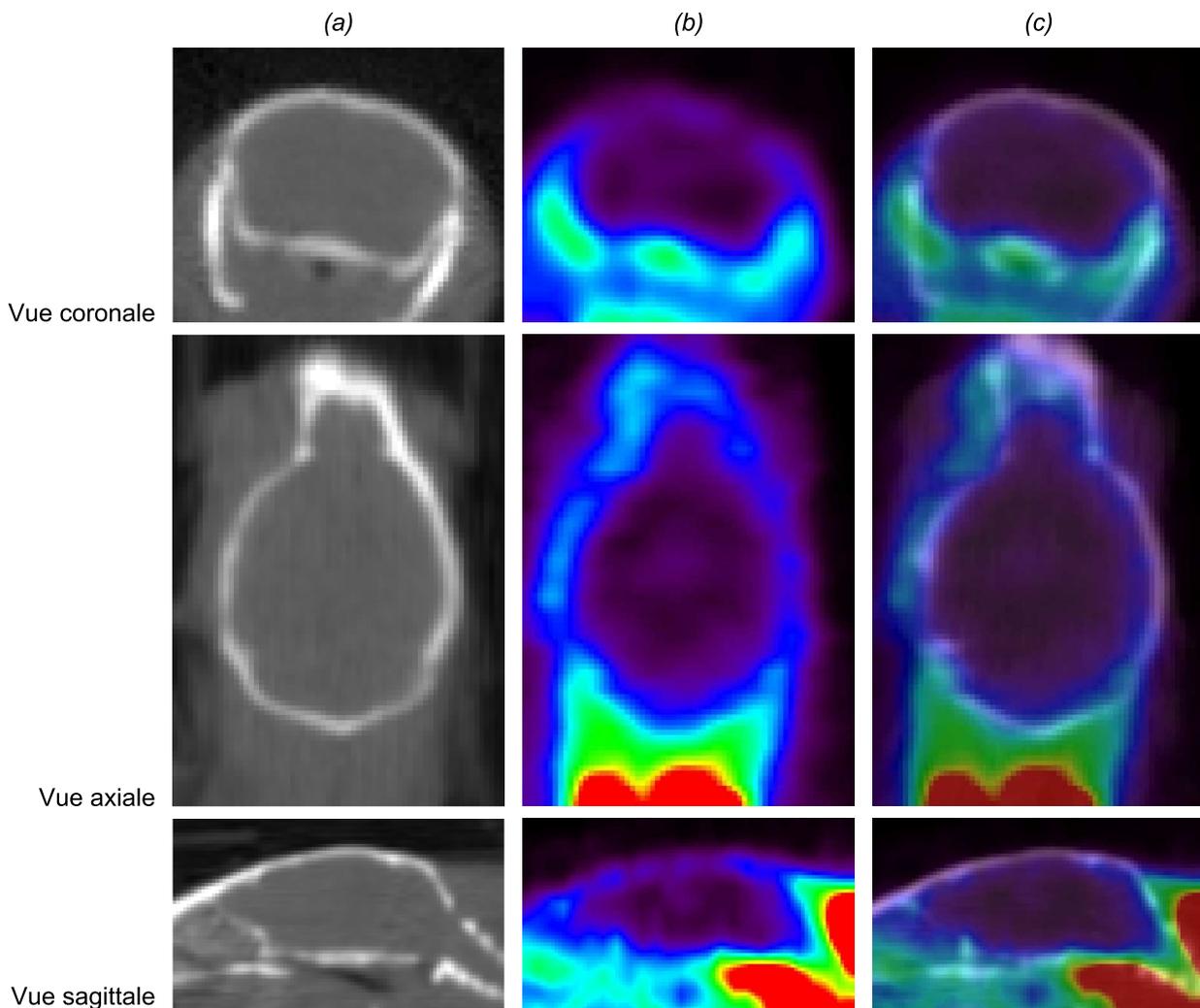


Figure 5.4 - Vues coronales, axiales et sagittale des images TDM (a) et TEP (b) du cerveau. Fusion des images TDM et TEP (c).

## 5.2.2 Atlas numérique utilisé pour cette étude

L'atlas numérique utilisé pour ce projet est le même que celui utilisé pour l'étude préliminaire sur la maladie d'Alzheimer. Il s'agit du modèle numérique proposé par le laboratoire du CIVM (Johnson et al., 2007; Badea et al., 2007), décrit dans le paragraphe 2.1.2 (p. 67).

Pour faciliter le recalage de l'atlas (et de l'IRM pondérée en T1 associée) sur les données expérimentales, nous avons utilisé les images que nous avons régularisées et dont le plan inter-hémisphérique a été redressé. Une description de ces traitements se trouve dans le paragraphe 3.1.1 (p. 79). Pour cette étude, les images IRM et atlas du cerveau entier incluant le bulbe olfactif et le cervelet ont été conservées figure 5.5.

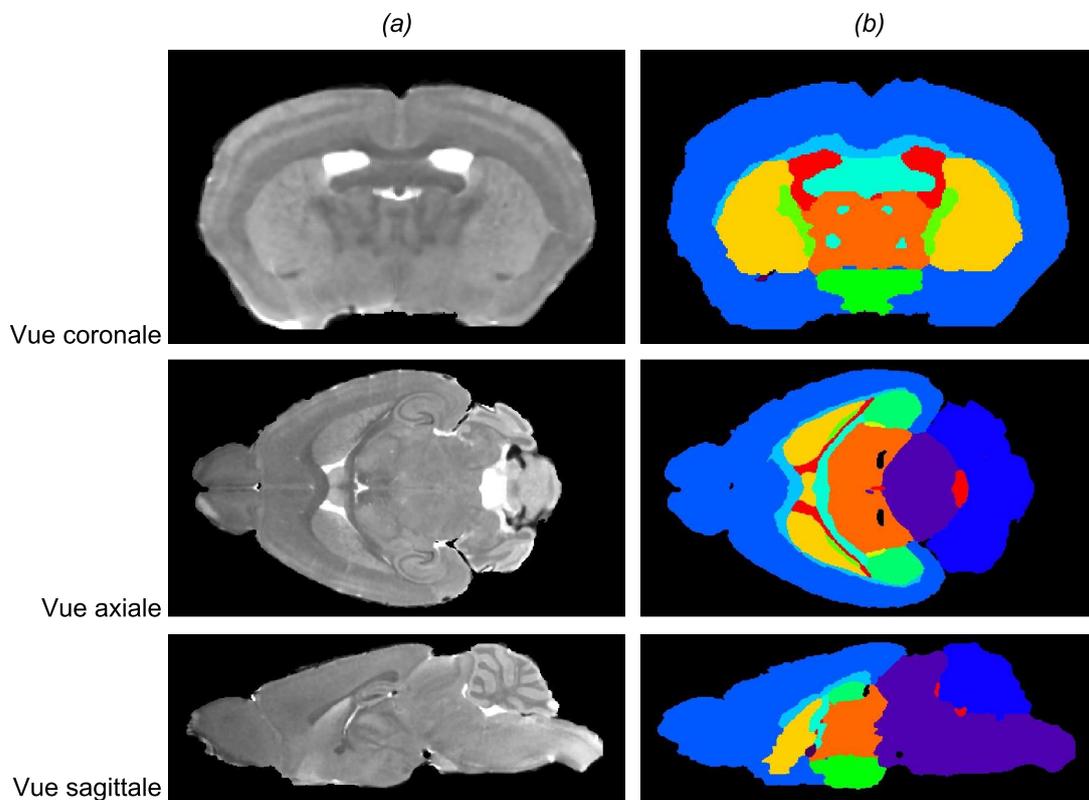


Figure 5.5 – Vues coronales, axiales et sagittales de l'IRM pondérée en T1 (a) et de l'atlas associé (b).

## 5.3 Mise en correspondance de l'atlas numérique sur les données TDM et TEP

Les figures 5.4(a) et (b) mettent en évidence l'absence de contraste entre les tissus cérébraux aussi bien sur les images TDM que TEP. De ce fait et contrairement au projet traité dans les chapitres précédents, un recalage basé sur des informations iconiques du cerveau n'était pas optimal. Nous avons alors orienté notre choix méthodologique vers des **techniques de recalage s'appuyant sur des primitives géométriques**. Nous avons pu ainsi tirer profit de l'information osseuse du crâne en TDM qui constitue la seule information exploitable. Une transformation affine a été testée pour mettre en correspondance les données de l'étude. Les images acquises au temps 1 sur la souris contrôle ont été traitées pour évaluer la faisabilité de notre approche de recalage pour analyser les données TEP au moyen d'un atlas numérique de cerveau de souris.

### 5.3.1 Stratégie de recalage proposée

Pour estimer la transformation entre l'atlas et les données à analyser, la stratégie proposée a été de mettre en correspondance les surfaces externes des cerveaux extraites de :

- l'examen TDM pour les données TEP/TDM (segmentation à réaliser) ;
- l'atlas numérique (segmentation directement disponible).

Une **carte des distances** basée sur la distance du **chanfrein** a été utilisée pour apparier les images de ces surfaces (voir [paragraphe 1.3.5.1 \(p. 30\)](#)).

Les principales étapes du recalage peuvent être résumées ainsi :

1. extraction de l'information relative aux surfaces externes du cerveau et utilisation de l'une des surfaces pour calculer une carte de distance ;
2. estimation de la transformation affine optimale et évaluation de la pertinence de la transformation estimée.

### 5.3.2 Extraction de la surface externe des cerveaux des images et création de la carte des distances

L'extraction de la surface externe du cerveau de souris à partir de l'examen TDM (cf. figure 5.6(a)) a requis une segmentation de la boîte crânienne et plus précisément de la surface interne. Cette étape présentant une complexité certaine et les travaux étant préliminaires, une approche de segmentation par seuillage a été considérée en première intention. Dans les images TDM, les structures osseuses apparaissent très clairement. Un seuillage fixé à  $2/3$  de la valeur maximale de l'image a été utilisée. La détermination de cette valeur a été confirmée par une estimation visuelle du résultat en prenant en compte l'épaisseur de la structure osseuse segmentée (de 1 à 3 pixels ce qui correspond à une épaisseur de  $\sim 0,5$  mm, figure 5.6(b)). La carte de distance a été calculée à partir de cette image binarisée. Cette information correspondant à la géométrie de référence des données à analyser, les pixels de la boîte crânienne ont été mis à la valeur zéro et les autres pixels de l'image ont été affectés de la valeur de leur distance au pixel de l'os le plus proche. Une illustration de la carte de distance ainsi calculée est présentée sur la figure 5.6(c).



Figure 5.6 – Vues coronales de la boîte crânienne de la souris étudiée sur une image TDM (a) et après binarisation de cette image (b). Carte des distances (c) créée à partir de l'image binaire utilisée par la suite pour recalibrer l'atlas sur les images expérimentales.

L'obtention de l'information de surface contenue dans les images relatives à l'atlas numérique a été réalisée par un seuillage de l'image des labels. A partir de cette image binaire, la surface a été calculée sous forme de triangles dont les sommets sont des vertex<sup>c</sup> correspondants chacun à des coordonnées  $x, y, z$  de l'espace. Le nombre de vertex étant compris entre  $10^5$  et  $10^6$ , nombre très important par rapport à la complexité de la surface à décrire, un travail d'optimisation du nombre de ces points à considérer pour estimer correctement la transformation de recalage a été mené. En réduisant le volume de données à traiter (par des facteurs  $10^2$  et  $10^3$ ), nous avons pu diminuer le temps de calcul nécessaire à l'estimation de la transformation. Une décimation progressive et uniformément appliquée à la surface a été mise en œuvre. La valeur limite de réduction a été estimée en mesurant les variations des transformations de recalage estimées, en prenant pour référence les résultats

c. Point d'intersection entre deux ou plusieurs segments dans une construction 3D.

obtenus avec la surface initiale. La décimation a été arrêtée dès que les paramètres de la transformation affine estimée ont commencé à diverger. Une illustration du processus de décimation est présentée [figure 5.7](#). Cette optimisation du temps de calcul trouvera toute son utilité pour le traitement des données du projet acquises ultérieurement.

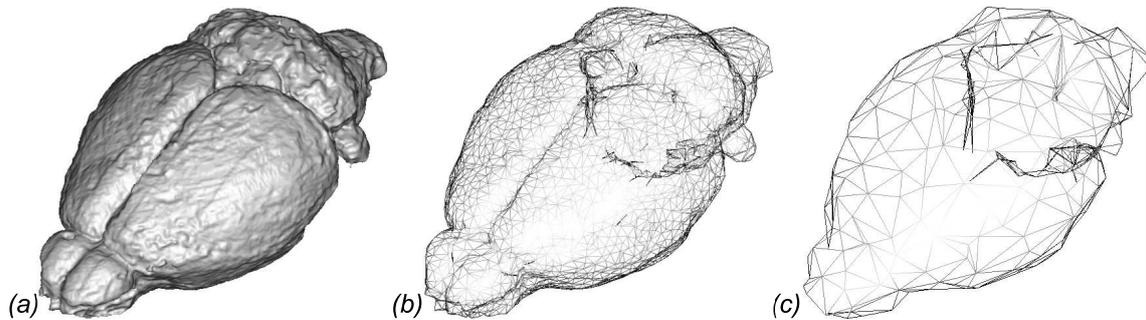


Figure 5.7 – Rendus surfaciques du cerveau de souris de l'atlas considérant l'intégralité des vertex le décrivant (a), puis après décimation à 99 % (b) et à 99,9 % de ceux-ci.

### 5.3.3 Estimation et évaluation de la transformation de recalage

Le processus de recalage a été initialisé en faisant coïncider par translation entière selon les directions  $x$ ,  $y$  et  $z$ , les centres de gravité calculés à partir de l'image binaire de l'examen TDM et de la surface de l'atlas numérique. Le processus de recalage a ensuite consisté à déplacer la surface issue de l'atlas dans la carte de distance issue de l'examen TDM en optimisant les paramètres de la transformation affine (optimisation séquentielle des paramètres par la méthode de Powell, voir [paragraphe 1.3.5.3 \(p. 33\)](#)). La minimisation de la distance moyenne entre les informations de surface a été utilisée comme critère de similarité pour estimer la transformation optimale. La condition d'arrêt de l'estimation du recalage a été fixée à 1 % de gain. Selon ce protocole, des essais successifs ont été menés en réduisant progressivement le nombre de vertex. Une estimation reproductible de la transformation a été observée jusqu'à une réduction de 99 % modifiant le nombre total de vertex de  $3 \cdot 10^5$  à  $\sim 3 \cdot 10^3$ . La distance moyenne finale entre les deux surfaces a été estimée à environ 0,1 mm. En considérant la surface initiale, le temps de calcul nécessaire était pour recalcer les images de 18 minutes. Après réduction du nombre de vertex, ce temps a été réduit à 18 secondes<sup>d</sup>.

d. Ces tests ont été réalisés sur un Intel<sup>®</sup> Xeon<sup>®</sup> CPU E5520 at 2,27 GHz avec 4 Go de RAM.

La figure 5.8(a) présente la superposition de l'examen TDM binarisé sur l'image de l'atlas labélisé et recalé. La figure 5.8(b) montre une seconde manière d'estimer la qualité du recalage en visualisant la superposition des contours extraits de l'IRM, utilisée pour générer l'atlas, sur l'examen TEP à analyser. Après recalage, la forme globale de l'atlas déformé se superpose correctement sur les données à analyser. Il reste cependant difficile d'estimer quantitativement la qualité du recalage.

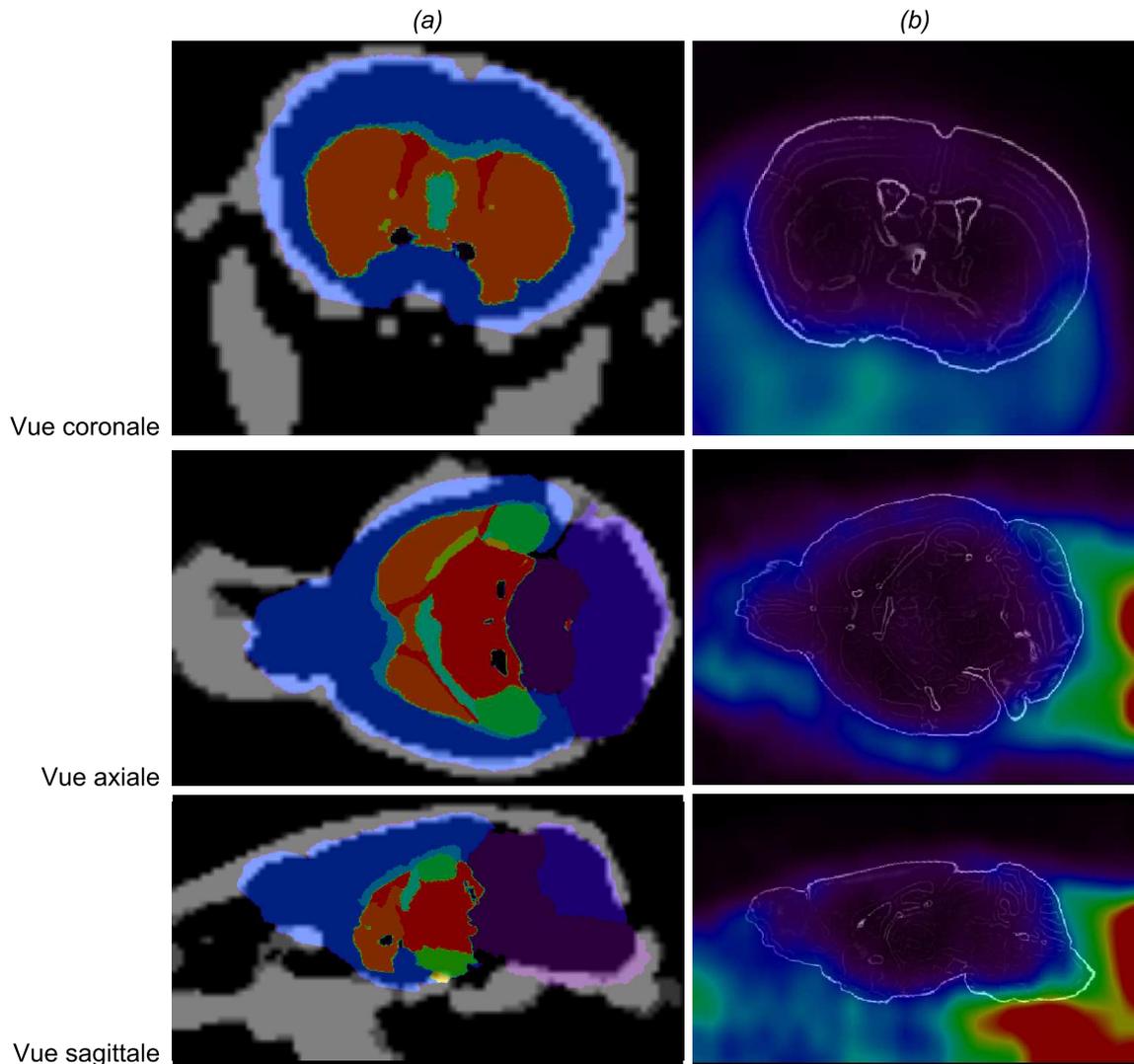


Figure 5.8 – Fusions, après recalage, du volume de labels sur l'image TDM binarisée (a) et des contours de l'IRM pondérée en T1 ayant servi à la création de l'atlas sur l'image TEP (b). Ces fusions montrent qu'après recalage, l'atlas se superpose correctement sur les données à analyser.

## 5.4 Discussion des résultats du recalage de l'atlas sur les données TEP et TDM

Etant donné l'absence d'informations cérébrales dans les images TEP et TDM, nous avons considéré une méthode de recalage basée sur des primitives géométriques. Un unique sujet contrôle a été utilisé pour étudier la faisabilité de l'analyse par atlas d'images TEP. Nous avons choisi d'estimer des paramètres de transformations rigides (translations des centres de gravité) puis affines. Pour optimiser le temps de calcul nécessaire à ces estimations, nous avons réduit, de façon uniforme, le nombre de vertex composant la surface externe du cerveau représentant l'atlas. Cette opération a démontré son efficacité en terme de gain en temps de calcul tout en permettant de conserver un résultat de recalage d'aussi bonne qualité que celui obtenu à partir de la surface initiale.

Le recalage ayant été estimé sur les contours externes du cerveau, la pertinence de ce dernier au niveau des structures cérébrales (striatum, hippocampe, thalamus, ...) n'a pu être évaluée. Au vu des informations disponibles, une transformation affine nous a semblé la plus adaptée pour mettre en correspondance l'atlas et les images TDM et TEP.

En admettant que l'information de la structure osseuse est très semblable sur les animaux contrôles voire pathologiques, l'application de notre méthode sur d'autres souris nous semble facilement transposable.

### 5.4.1 Limitation de la méthode

La figure 5.8 (p. 166) montre que le recalage de l'atlas sur les données TEP et TDM n'est pas optimal en tout point : la surface externe du cerveau de l'atlas se superpose à la boîte crânienne à certains endroits alors qu'il devrait coïncider avec la surface interne de cette dernière. Cette observation est probablement due à l'incertitude résidant au niveau de l'extraction de la surface de la boîte crânienne sur l'image TDM. Le seuil choisi pour binariser cette image nous a fourni une surface dont l'épaisseur valait  $\sim 0,5$  mm. La carte des distances ayant été créée à partir de cette image binarisée, des erreurs de recalage ont pu être engendrées. La condition d'arrêt de l'estimation du recalage (fixée à 1 % de gain) a permis de minimiser la distance entre les deux surfaces jusqu'à une valeur inférieure à l'épaisseur de la surface de la boîte crânienne extraite de l'image TDM.

Le recalage non optimal en tout point de la surface de la boîte crânienne peut également être dû au nombre limité de degrés de libertés utilisé pour apparier les images ; une transformation affine ne peut en effet optimiser que jusqu'à 12 degrés de liberté.

## 5.4.2 Amélioration de la méthode

Compte-tenu des limitations précédemment énoncées, nous proposons, dans les paragraphes suivants, deux nouvelles pistes qui pourraient permettre l'optimisation du recalage de l'atlas sur les images TEP et TDM.

### 5.4.2.1 Amélioration de la segmentation de l'examen TDM

Pour ce travail préliminaire, nous avons extrait la boîte crânienne par des méthodes de seuillage. Pour s'affranchir de la variabilité de l'épaisseur de la cavité osseuse résultant de cette méthode, nous envisageons d'extraire la surface interne de la boîte crânienne en utilisant des méthodes de segmentation basée sur la croissance de régions (se reporter au [paragraphe 1.4.2](#) (p. 40)). Des recherches ont d'ores et déjà été engagées sur cette thématique.

### 5.4.2.2 Acquisitions de données supplémentaires

Si des **IRM** peuvent être **acquises** en plus des données TEP et TDM sur chacun des sujets à étudier, des informations sur les structures anatomiques cérébrales seraient alors disponibles. Un **recalage non affine**, tel que celui reposant sur la méthode de la *Free Form Deformation* proposée dans [Rueckert et al. \(1999\)](#) pourrait être envisagé **pour mettre en correspondance l'IRM associée à l'atlas avec les IRM expérimentales**. La **stratégie** appliquée pour recalcr ces images pourrait être celle proposée dans le [chapitre 3](#) (p. 78). Une transformation rigide pourrait être estimée entre les surfaces externes des cerveaux de l'IRM et de l'image TDM associée pour chacune des souris étudiées. Une **composition de transformations géométriques** pourrait alors être calculée pour **recaler les segmentations de l'atlas sur chaque image TEP**. Le développement d'un **nouveau module** dans **BrainVISA** intégrant l'ensemble des opérations nécessaires à ce type d'analyse pourrait être envisagé pour faciliter le traitement des données réalisé par des non-experts en traitement de l'image.

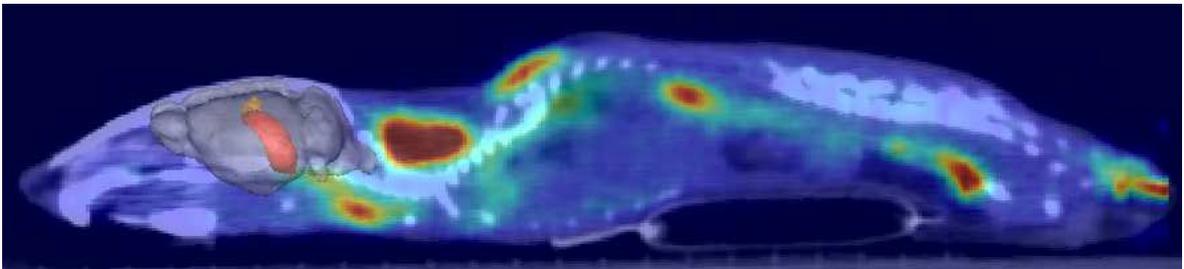
## 5.5 Bilan de l'utilisation d'un atlas en vue d'une analyse de volumes TEP et valorisation des travaux

L'objectif du projet présenté dans ce chapitre a été d'évaluer la faisabilité d'analyser des images cérébrales acquises en TEP sur la Souris en utilisant les régions définies dans un atlas 3D.

Les travaux préliminaires présentés et discutés ici ont permis de proposer une méthode permettant de recalculer un modèle numérique de cerveau de souris sur les images TDM acquises simultanément avec les images fonctionnelles à étudier. Les résultats obtenus en utilisant des images acquises sur une souris contrôlée suggèrent la faisabilité de l'approche. Des pistes méthodologiques sont envisagées pour améliorer le recalage. L'ensemble de ces travaux préliminaires a été **valorisé** lors de la **conférence internationale** de 2010 de l'IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC) (Delzescaux et al., 2010).

Une base de données TEP et TDM acquises sur plusieurs dizaines de souris contrôlées et pathologiques est en cours de constitution pour le projet de recherche mené en collaboration avec l'ANSTO. L'approche d'analyse proposée dans ce chapitre devrait permettre d'automatiser les analyses des données fonctionnelles (les interventions d'opérateurs seraient limitées) et de les rendre plus reproductibles. Le traitement d'un grand nombre d'images sur plusieurs sujets serait alors mieux appréhendé. L'obtention d'une quantité importante de résultats permettrait de bien caractériser la pathologie étudiée ainsi que son évolution. Si par ailleurs le modèle numérique est latéralisé comme illustré en [figure 4.11](#), nous pourrions de plus étudier la symétrie de la pathologie concernée.

*Les travaux présentés dans ce chapitre ont montré la faisabilité de guider l'analyse d'images cérébrales acquises en TEP et en TDM en utilisant les segmentations d'un atlas numérique (voir figure 5.9). La méthode proposée s'appuie sur le recalage affine du modèle numérique sur la surface interne de la boîte crânienne pouvant être extraite de l'image TDM. L'approche proposée constitue une perspective à mon projet de thèse présenté dans les chapitres précédents. Si des images peuvent être acquises in vivo et post mortem sur des mêmes sujets, nous pourrions utiliser un atlas numérique 3D pour mener une analyse anatomique et fonctionnelle sur chacun des jeux de données et ainsi comparer les informations complémentaires.*



*Figure 5.9 - Rendus surfaciques d'un atlas numérique 3D de cerveau de souris et de ses hippocampes superposés à la fusion des images TDM et TEP acquises sur une souris corps entier (vue sagittale).*

# Conclusion et perspectives

La résolution des images de cerveau du petit animal acquises *in vivo* est encore limitée au regard de la taille des structures observées. Les modalités d'imagerie *post mortem* (coupes histologiques et autoradiographiques) restent encore aujourd'hui la référence pour une étude anatomo-fonctionnelle précise, bien que la cohérence 3D de l'organe soit perdue. L'analyse de ces images est souvent réalisée en segmentant manuellement des régions d'intérêt. De ce fait, le nombre de coupes et de régions étudiées est limité. Pour traiter un plus grand nombre de données et restaurer la cohérence tridimensionnelle de l'organe, des travaux ont été réalisés pour reconstruire des volumes à partir de séries de coupes. Une méthode, notamment mise en place au sein de notre laboratoire, consiste à s'appuyer sur des photographies des plans de coupe. La reconstruction tridimensionnelle a permis de prendre en compte une grande quantité de données dans les études pré-cliniques. Des travaux ont ensuite été menés pour tirer profit de cette quantité de données disponibles. Quelques équipes sont par exemple parvenues à extraire de nouvelles informations sur des images *post mortem* reconstruites en 3D en comparant statistiquement l'intensité des pixels d'un jeu de données. Cependant, cette approche d'analyse présente des limitations quant à l'interprétation des résultats et doit être appliquée sur des groupes d'images.

L'objectif de cette thèse, présenté en fin de **chapitre 1**, a donc été de proposer une nouvelle approche d'analyse des reconstructions tridimensionnelles de données *post mortem* permettant d'accéder à des informations anatomiques et fonctionnelles jusqu'à présent difficiles à obtenir. Une approche basée sur l'utilisation d'un atlas numérique 3D a été proposée. Dans le cadre d'études pré-cliniques, cette méthodologie d'analyse d'images tridimensionnelles était jusqu'alors déployée pour étudier principalement des volumes IRM. A notre connaissance, des données *post mortem* anatomiques et fonctionnelles reconstruites en 3D n'ont jamais été analysées par cette technique.

Nous avons testé cette approche d'analyse en utilisant deux atlas numériques de cerveaux de souris mis à la disposition de la communauté scientifique. Ces modèles ont été créés à partir de données IRM acquises sur des souris dites sauvages. Le jeu de données expérimentales considéré pour notre étude a été acquis dans le cadre d'une étude préliminaire sur la maladie d'Alzheimer. Les souris étudiées étaient issues de deux modèles transgéniques différents.

Seul un hémisphère de chaque animal a été étudié. L'ensemble de ces données a été présenté dans le **chapitre 2**.

La stratégie d'analyse développée dans ce projet de recherche s'est appuyée sur le recalage du modèle numérique sur les données expérimentales. L'étude de faisabilité de cette mise en correspondance d'images multimodales a été validée qualitativement et quantitativement en utilisant un des deux atlas récupérés. Une étude comparative a ensuite été menée pour sélectionner le modèle numérique le plus adéquat pour analyser nos images. L'analyse anatomo-fonctionnelle de notre jeu de données expérimentales a pu être menée à l'échelle des segmentations de l'atlas. Ces études et résultats ont fait l'objet du **chapitre 3** et de publications scientifiques valorisées lors de conférences internationales et dans un journal (voir respectivement [Lebenberg et al. \(2009a,b\)](#); [Dubois et al. \(2010a\)](#) et [Lebenberg et al. \(2010a\)](#)). Les travaux réalisés ont montré qu'un atlas numérique 3D basé sur des IRM acquises *intra cranium* pouvait être recalé et permettre l'analyse de reconstructions tridimensionnelles de données acquises après extraction et coupe de l'organe d'intérêt. De plus, les résultats obtenus ont montré que **l'analyse par atlas de données *post mortem* reconstruites en 3D permettait d'optimiser le temps de traitement, la quantité de données traitées et la reproductibilité de l'analyse de ces données**. L'étude de l'effet de thérapeutiques, développées par des industriels ou des centres académiques, sur un nombre important d'animaux modélisant une pathologie humaine est à présent possible à l'échelle des segmentations de l'atlas. La stratégie d'analyse a été développée et testée pour analyser des images de cerveau de souris. Cependant, la méthode proposée pourrait être utilisée dans le cadre d'études sur d'autres espèces (autres rongeurs tels que le Rat ou bien sur le Primate), sous réserve d'avoir un accès à un atlas et à des volumes *post mortem* de qualité au moins équivalente.

L'analyse par atlas présente cependant des limitations : les variations fonctionnelles inter-groupe concentrées dans des zones petites par rapport à la taille des segmentations définies dans l'atlas ne sont pas détectées. L'analyse par comparaison statistique des intensités des pixels des images permet quant à elle de les mettre en évidence. Interpréter les résultats d'une telle analyse menée sur des données cérébrales de rongeur reste néanmoins complexe, en particulier en ce qui concerne l'indexation dans des structures anatomiques des petites zones de différences d'activités résultant de l'analyse statistique. Un deuxième travail de ce projet de recherche a ainsi consisté à évaluer si la supervision de cette approche d'analyse par un atlas numérique pouvait permettre de coupler les avantages fournis par chacune de ces méthodes. L'approche proposée s'est appuyée sur la mise en correspondance de l'atlas numérique avec la carte statistique paramétrique fournie par l'analyse statistique. Cette étude a fait l'objet du **chapitre 4** et a été valorisée lors d'une conférence internationale ([Lebenberg et al., 2010b](#)). Une fois les segmentations du modèle numérique dans le référentiel de l'image paramétrique, les zones de différences d'activités inter-groupe ont pu être indexées automatiquement dans les régions cérébrales définies par l'atlas. **L'apport direct de cette méthode a été de réduire le temps consacré à indexer et à quantifier**

**l'appartenance de ces zones dans des régions cérébrales, et de mettre en évidence des structures anatomiques potentiellement impliquées dans la maladie d'Alzheimer.** De telles conclusions n'avaient pas pu être observées sans l'utilisation de l'atlas. La combinaison des approches d'analyse a donc permis d'accéder à des informations supplémentaires. Son efficacité et son utilité devraient être confirmées sur un jeu de données plus complexes, dans le cas par exemple d'une étude réalisée sur cerveaux entiers présentant un nombre encore plus important de zones de variations métaboliques. Un projet en collaboration avec un industriel du médicament est actuellement en cours pour tester l'effet d'une molécule dans le cadre d'une étude sur la maladie d'Alzheimer.

Les méthodes proposées et les résultats discutés dans ces deux chapitres ont permis de démontrer que l'utilisation d'un atlas numérique 3D optimisait l'analyse de volumes *post mortem*. Un dernier travail a été mené sur des images cérébrales de souris sauvages acquises en TEP et en TDM. L'objectif du travail confié à notre équipe a été d'évaluer la faisabilité de localiser la fixation de traceurs radioactifs dans le cerveau de souris sur une image acquise *in vivo* et en utilisant les segmentations disponibles dans l'atlas. Un travail préliminaire sur ce projet est décrit et discuté dans le **chapitre 5** et a été valorisé lors d'une conférence internationale (Delzescaux et al., 2010). Il a consisté à mettre en place le recalage du modèle numérique sur une image TDM acquise simultanément avec l'image fonctionnelle. Les résultats obtenus suggèrent la faisabilité de notre approche. Une nouvelle base de données est en cours de constitution pour un projet de recherche mené en collaboration avec l'Australian Nuclear Science and Technology Organisation.

L'ensemble des travaux présentés dans ce travail de thèse a permis de démontrer la faisabilité et les avantages issus de l'analyse par atlas numérique 3D de données anatomo-fonctionnelles de cerveau de souris. Cette approche d'analyse automatise et optimise l'interprétation des résultats. Des études pré-cliniques comptabilisant un nombre important d'animaux peuvent être envisagées.

L'utilisation des structures définies dans un atlas numérique 3D ouvre par ailleurs la porte à de nouvelles perspectives.

Dans ce projet de recherche, les segmentations ont permis de quantifier pour chaque structure anatomique le métabolisme cérébral mis en évidence sur des données autoradiographiques. Si d'autres marqueurs étaient utilisés, nous pourrions mesurer pour les mêmes régions cérébrales d'autres informations. La coloration au rouge Congo permet par exemple de révéler la présence de plaques amyloïdes dans le cerveau. Si la segmentation de ces dernières est réalisée en s'appuyant par exemple sur les travaux décrits dans Feki et al. (2007), la mise en correspondance d'un atlas numérique sur des données marquées par cette coloration et reconstruites en 3D permettrait d'**évaluer la charge amyloïde au niveau de chaque région cérébrale.**

Enfin, si des images peuvent être acquises *in vivo* puis *post mortem* sur des mêmes animaux, la comparaison des analyses menées sur les deux jeux de données pourrait être effectuée par le biais de l'atlas numérique utilisé ici. Les travaux présentés dans les chapitres 3 et 5 montrent en effet que l'atlas numérique fourni par le laboratoire du CIVM peut aussi bien être recalé sur des images cérébrales de souris acquises *post mortem* que *in vivo*. Nous pourrions par exemple étudier et comparer les propriétés de liaisons ligand-récepteur mises en évidence par les imageries TEP et en autoradiographie. Dans le cas d'une étude de la charge amyloïde cérébrale chez la souris, les plaques amyloïdes pourraient être visualisées *in vivo* par IRM (Petiet et al., 2010) et *post mortem* grâce à la coloration de coupes au rouge Congo. Si ces dernières données sont reconstruites en 3D, les recalages de l'atlas d'une part sur les IRM acquises et d'autre part sur les volumes histologiques permettraient de comparer la charge amyloïde évaluée sur chaque jeu de données. Ce travail sous-entend la capacité à segmenter des plaques amyloïdes sur les IRM. Mais la perspective d'**utiliser un seul et même outil d'analyse, l'atlas numérique, pour étudier des images *in vivo* et *post mortem* faciliterait l'interprétation des données acquises. Il serait alors possible d'optimiser des protocoles d'acquisition des images *in vivo* en se basant sur les données de référence acquises *post mortem*.**

De tels travaux soulignent l'importance de mettre en place et de mener des études de recherche (bio)médicale par des équipes pluridisciplinaires. La collaboration de biologistes ou médecins avec des physiciens et méthodologistes permet de développer et d'améliorer les outils d'acquisition, de traitement et d'analyse des données les plus à même à répondre à une question biologique ou médicale.

# Annexe A

## Recalage par appariement de blocs / Principe du Block Matching

Le **Block Matching** (BM) est une méthode initialement développée pour la compression vidéo (mpeg). Par la suite, cette méthode a été utilisée pour recalibrer deux images et, de proche en proche, reconstruire un volume (3D) à partir de coupes histologiques (Ourselin et al., 2001).

Cette approche consiste à décomposer une image à recalibrer (dite “test”) en de nombreuses imagerie et à rechercher, pour chacune d’entre elles, la région correspondante dans la seconde image dite de “référence” en optimisant un critère de similarité. Lorsque les blocs sont suffisamment petits, l’hypothèse qu’il existe une relation linéaire entre les intensités des images peut être admise même si les images ont été acquises dans des modalités différentes. Le coefficient de corrélation peut ainsi être utilisé comme critère de similarité.

Chaque bloc étant localisé spatialement, nous estimons, pour chacun d’entre eux et dans un voisinage défini par leur taille, la translation  $t_i$  qui le superpose avec un bloc similaire de l’image de référence. L’ensemble de ces  $t_i$  forme un *champ de déplacement* de l’image test vers l’image de référence.

Notons que les blocs homogènes dont la variance est nulle ou faible, ou ne respecte pas les conditions imposées sur les niveaux de gris par exemple, sont éliminés. Il en est de même pour les appariements gagnants présentant un score de similarité trop faible. Cette approche permet d’écartier des sous-parties de l’image considérées sans information pertinente pour le recalibrage. Cette dernière considération s’avère très utile pour le recalibrage de coupes histologiques ou autoradiographiques car les images peuvent souffrir d’artefacts inhérents au protocole d’acquisition (exemple du plissement de coupes qui peut influencer sur l’intensité d’une partie de l’image).

La transformation globale  $T_0$  a été évaluée en minimisant, aux sens des moindres carrés, l’écart entre les appariements initiaux définis par les  $t_i$  et les déplacements induits par  $T_0$ .

A l’issue de cette étape, l’opération est réitérée en considérant cette fois-ci la nouvelle image test transformée par  $T_0$ . Le processus est itéré jusqu’à ce que le critère d’arrêt choisi soit satisfait (nombre d’itérations fixe, évolution des transformations, ...). La transformation finale est obtenue en composant les  $T_0$  estimées.

Pour gagner en robustesse et en qualité de recalage, une approche pyramidale peut être intégrée au processus. Cette approche consiste à considérer initialement des images sous-échantillonnées, pour capturer les principales déformations, puis à itérer à un échantillonnage plus fin. Le champ d'exploration étant proportionnel à la taille des blocs (échantillonnage de l'image), cette approche facilite l'estimation de grands déplacements aux premiers niveaux de la pyramide, minimisant ainsi les problèmes de minima locaux.

Le principe de ce recalage est illustré en [figure A.1](#).

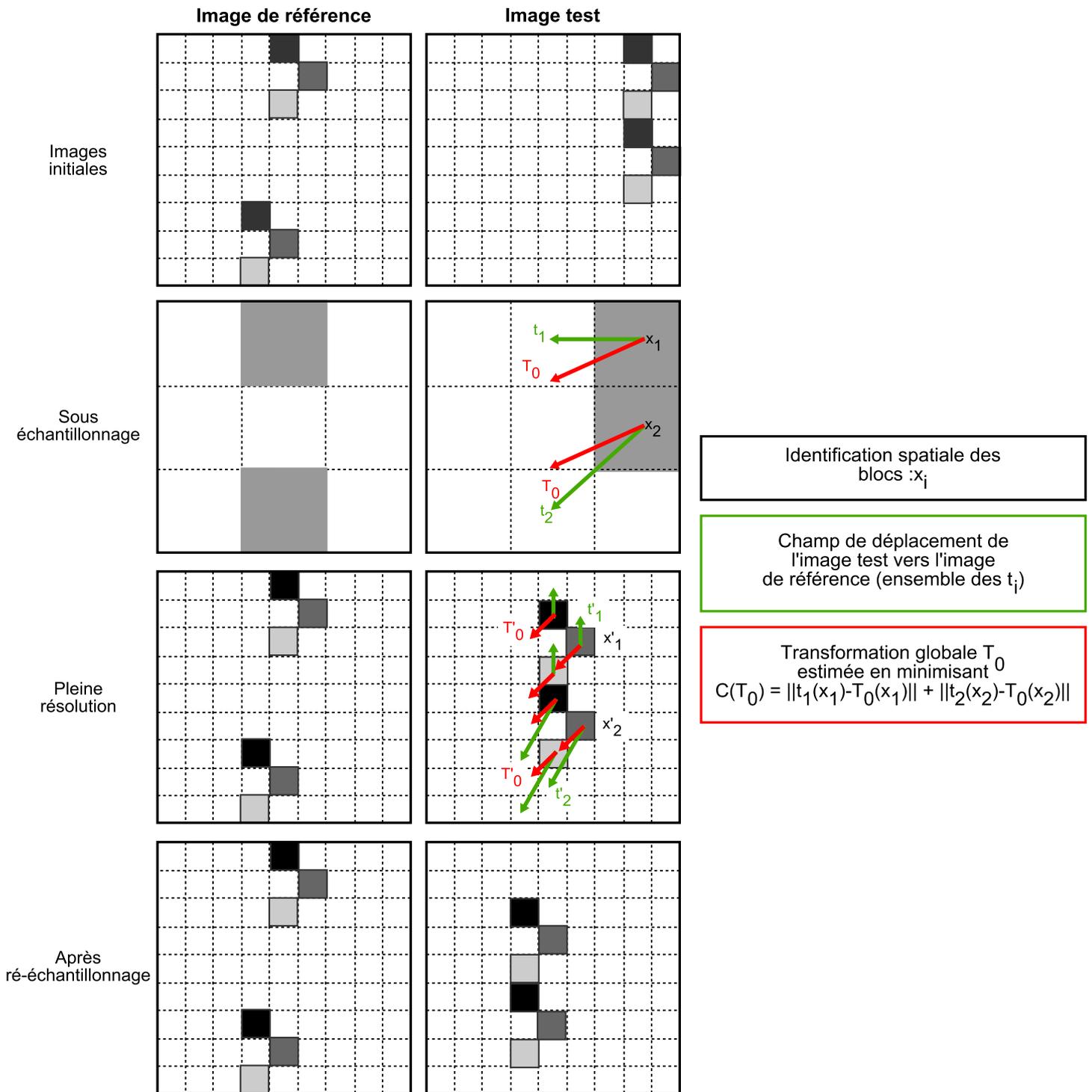


Figure A.1 – Recalage par appariement de blocs d'une image test sur une image de référence.

# Annexe B

## Liste des structures présentes dans l'atlas créé par le LONI

Le tableau B.1 présente l'index des structures tel qu'il a été téléchargé sur le réseau du BIRN.

Ce tableau montre que l'atlas créé par le LONI est constitué de régions numérotées de 6980 à 10582 et de 65000 à 65003.

Nous remarquons que plusieurs structures ont été référencées à la même adresse (en bleu dans la 2<sup>ème</sup> colonne) et qu'une même structure peut être identifiée par deux labels différents (exemple du *lateral septal nucleus* en rouge dans la 3<sup>ème</sup> colonne). Sans précision sur ces points malgré une recherche sur le site de téléchargement, nous avons considéré que ces informations étaient erronées et que les structures en question ne représentaient qu'une seule région au lieu de deux.

En étudiant individuellement chacune de ces segmentations, nous avons remarqué que :

- la segmentation nommée *brain* (label 10000) représentait en réalité le tronc cérébral (*brainstem* en anglais).
- la segmentation du nerf optique (label 10381) représentait en réalité le chiasme optique (*optic chiasm* en anglais).
- la segmentation du chiasme optique (label 10564) représentait en réalité le nerf optique (*optic nerve* en anglais).
- la segmentation du fornix (label 10576) représentait en réalité la fimbria.

Labels	Adresses mémoire	Structures
6980	0xf000000	1 <sup>st</sup> Cerebellar lobule
6981	0xf808080	3 <sup>rd</sup> Ventricle
6982	0xfffffff	4&5 <sup>th</sup> Cerebellar lobules
6983	0xf000000	4 <sup>th</sup> Ventricle
6984	0xf000000	5 <sup>th</sup> Cerebellar lobule
7199	0xf00fff	Fasciculus retroflexus
7265	0xf7f80ff	Internal capsule
7327	0xf00fff	Lateral septal nucleus
7328	0xf7f8080	Lateral septal nucleus dorsal part
7329	0xf7f80ff	Lateral septal nucleus intermediate part
7335	0xf807f7f	Lateral ventricle
7620	0xf000000	Stria terminalis
10000	0xfff7f80	Brain
10002	0xfff7fff	Cerebral cortex
10047	0xf808000	Olfactory system
10073	0xf80807f	Lateral olfactory tract
10075	0xf80ff00	Hippocampal region
10091	0xf80ff7f	Basal ganglia
10098	0xfff8000	Pallidum
10109	0xfff807f	Caudate putamen
10122	0xfffff00	Lateral septal nucleus
10186	0xfffff7f	Thalamus
10263	0xf808080	Hypothalamus
10330	0xf8080ff	Corpus callosum
10349	0xf80ff80	Interpeduncular nucleus
10369	0xf80fff	Substantia nigra
10381	0xfff8080	Optic nerve
10410	0xfff80ff	Cerebellum
10564	0xfffff80	Optic chiasm
10565	0xfffffff	Third ventricle
10567	0xf000000	Fourth ventricle
10576	0xf00007f	Fornix
10582	0xf007f00	Spinal cord
65000	0xf007f7f	Anterior commissure, posterior part
65001	0xf7f0000	Anterior commissure, anterior part
65002	0xf7f007f	Cerebral aqueduct
65003	0xf7f7f00	Stria medullaris, thalamus

Tableau B.1 – Liste des structures segmentées par l'équipe du LONI pour construire leur atlas. De gauche à droite : label attribué à la structure, adresse mémoire réservée à la structure et nom de la région segmentée d'après Paxinos and Franklin (2001).

Ne pouvant par ailleurs pas considérer des segmentations composées de trop de composantes connexes et de trop petite taille, nous avons apporté les modifications suivantes :

- nous avons intégré la segmentation du *stria medullaris, thalamus* (label 7620) à celle du thalamus (label 10186).
- nous n'avons pas tenu compte des segmentations du lateral septal nucleus (label 10122), du pallidum (label 10098) et du stria terminalis (label 7620).

Pour faciliter l'exploitation des segmentations, nous les avons relabellisées. Les segmentations finales retenues sont listées dans le [tableau B.2](#).

Labels	Structures
1	Anterior commissure _ anterior part
2	Anterior commissure _ posterior part
3	Basal ganglia
4	Brainstem
5	Caudate putamen
6	Cerebellum
7	Cerebral aqueduct
8	Cerebral cortex
9	Corpus callosum
10	Fasciculus retroflexus
11	Fimbria
12	Fourth ventricle
13	Hippocampal region
14	Hypothalamus
15	Internal capsule
16	Interpeduncular nucleus
17	Lateral olfactory tract
18	Lateral ventricle
19	Olfactory system
20	Optic chiasm
21	Optic tract
22	Spinal cord
23	Substantia nigra
24	Thalamus
25	Third ventricle

*Tableau B.2 – Liste des segmentations retenues après examen individuel des segmentations issues de l'atlas mis à disposition par l'équipe du LONI. De gauche à droite : label attribué à la structure, et nom de la région segmentée.*

# Annexe C

## Liste des structures présentes dans l'atlas créé par le CIVM

Le [tableau C.1](#) présente l'index des structures tel qu'il a été téléchargé sur le réseau du BIRN.

Ce tableau montre que l'atlas créé par le CIVM est constitué de régions numérotées de 1 à 33. L'attribution des labels aux structures suit vraisemblablement un ordre antéro-postérieur et dorso-ventral.

Pour ce projet de thèse, quelques modifications ont été apportées aux segmentations fournies par le CIVM :

- la segmentation du caudate putamen (label 3) a été fusionnée avec celle de l'accumbens nucleus (label 18). Nous nommons la fusion de ces deux régions *striatum*.
- la partie “étendue” de l'amygdale (*extended amygdala* en anglais) a été segmentée à partir de la segmentation du cortex (label 1) puis fusionnée avec la structure segmentée “amygdala” (label 8).
- la segmentation de la commissure antérieure (label 17) fournie par le CIVM comprenait deux composantes connexes. Nous avons intégré la plus petite dans la région du bulbe olfactif (label 7).
- la segmentation du nerf trijumeau du tronc cérébral (label 31) a été intégrée à la région du tronc cérébral (label 4).
- les noyaux du thalamus (labels 16 et 27) ont été intégrés dans la segmentation du thalamus (label 5).

Labels	Adresses mémoire	Structures
1	0xfc2c4f2	Cerebral cortex
2	0xf00fa9a	Cerebellum
3	0xf6fd2e3	Caudate putamen
4	0xfffa28b	Brainstem
5	0xffff7f00	Thalamus
6	0xf7f7f00	Hippocampus
7	0xfc1cc89	Olfactory bulb
8	0xfffff00	Amygdala
9	0xffff007f	Hypothalamus
10	0xf007f80	Superior colliculus
11	0xffff6666	Inferior colliculus
12	0xf7f0080	Lateral lemniscus
13	0xf8e388e	Periaqueductal gray
14	0xf993300	Septal nuclei
15	0xf317023	Fimbria
16	0xf83b470	Ventral nuclei of the thalamus
17	0xf060684	Anterior commissure
18	0xf00ff00	Nucleus accumbens
19	0xf009acd	Pontine nuclei
20	0xf808080	Substantia nigra
21	0xffff00ff	Cerebral peduncle
22	0xf7fff00	Interpeduncular nucleus
23	0xf7fff7f	Cochlear nuclei
24	0xf664a85	Globus pallidus
25	0xfcb0447	Internal capsule
26	0xffcfcc4	Mesencephalic reticular nuclei
27	0xf00ffff	Laterodorsal nucleus of thalamus
28	0xf00ff00	Geniculate nuclei
29	0xf7f80ff	Anterior pretectal nucleus
30	0xf5e2612	Optic tract
31	0xfffffff	Spinal trigeminal tract
32	0xf9a0404	Corpus callosum
33	0xfaefdca	Ventricular system

Tableau C.1 – Liste des structures segmentées par l'équipe du CIVM pour construire leur atlas. De gauche à droite : label attribué à la structure, adresse mémoire réservée à la structure et nom de la région segmentée d'après *Paxinos and Franklin (2001)*.

Pour faciliter l'exploitation des segmentations, nous les avons relabellisées. Les segmentations utilisées pour mes travaux de thèse sont listées dans le [tableau C.2](#).

Labels	Structures
1	Anterior commissure
2	Brainstem
3	Cerebellum
4	Cerebral cortex
5	Corpus callosum
7	Hippocampus
8	Hypothalamus
9	Internal capsule
10	Optic tract
11	Striatum
12	Thalamus
13	Ventricles
14	Olfactory bulb
15	Substance nigra
16	Inferior colliculus
17	Septum / Fimbria
18	Superior colliculus
19	Amygdala
20	Globus pallidus

*Tableau C.2 – Liste des segmentations utilisées dans ce projet de thèse, issues de l'atlas mis à disposition par l'équipe du CIVM. De gauche à droite : label attribué à la structure, et nom de la région segmentée.*

Note : Une fois la labellisation par ordre alphabétique effectuée, nous avons fusionné la segmentation de la fimbria avec celle du septum (nommé *septal nuclei* dans le [tableau C.1](#)). Ceci explique l'absence de segmentation dont l'intensité des pixels vaut "6" dans le [tableau C.2](#).

# Annexe D

## Homogénéisation de la définition des structures des deux atlas

Pour être en mesure de comparer les segmentations des atlas fournis par les équipes du CIVM et du LONI (cf. [annexes B \(p. 178\)](#) et [C \(p. 181\)](#)), nous les avons homogénéisées.

Le [tableau D.1](#) présente les agglomérats des segmentations initiales des atlas réalisés nouvellement nommés et labellisés.

Note : Les segmentations du chiasme optique (*optic chiasm* en anglais) et du nerf latéral olfactif (*lateral olfactory tract* en anglais) d'une part, puis celles de l'aire préteectale antérieure (*anterior preteectal area* en anglais) et du pédoncule cérébral (*cerebral peduncle* en anglais) des atlas fournis respectivement par le LONI et le CIVM n'ont pas été prises en compte.

Labels	Nomenclature finale	Nomenclature des atlas	LONI	CIVM
1	<b>Commissure antérieure</b>	Anterior commissure		X
		Anterior part	X	
		Posterior part	X	
2	<b>Tronc cérébral</b>	Brainstem	X	X
		Lateral lemniscus		X
		Midbrain		
		Periaqueductal gray		X
		Deep mesencephalic nucleus		X
		Interpeduncular nucleus	X	X
		Spinal cord	X	
		Superior colliculi		X
		Inferior colliculus		X
		Pontine nuclei		X
3	<b>Cervelet</b>	Cerebellum	X	X
		Cochlear nuclei		X
4	<b>Cortex cérébral</b>	Cerebral cortex	X	X
		Amygdala		X
5	<b>Corps calleux</b>	Corpus callosum	X	X
6	<b>Fimbria</b>	Fimbria	X	X
7	<b>Hippocampe</b>	Hippocampus	X	X
8	<b>Hypothalamus</b>	Hypothalamus	X	X
9	<b>Capsule interne</b>	Internal capsule	X	X
10	<b>Tractus optique</b>	Optic tract	X	X
11	<b>Striatum</b>	Caudate Putamen	X	X
		Basal Ganglia	X	
		Globus pallidus		X
		Accumbens nucleus		X
		Amygdalo Striatum Transition Area		X
		Septum		X
12	<b>Thalamus</b>	Thalamus	X	X
		Laterodorsal		X
		Ventral nuclei		X
		Geniculate complex		X
		Fasciculus retroflexus	X	
13	<b>Ventricules</b>	Ventricular system		X
		Fourth ventricle	X	
		Lateral ventricle	X	
		Third ventricle	X	
		Cerebral aqueduc	X	
14	<b>Bulbe olfactif</b>	Olfactory bulb	X	X
15	<b>Substance noire</b>	Substantia nigra	X	X

Tableau D.1 – Homogénéisation des segmentations issues des atlas fournis par le LONI et le CIVM (les segmentations initiales des atlas sont marquées d'une croix). Une fois cette opération réalisée, les agglomérats ont été relabellisés (1<sup>ère</sup> colonne en partant de la gauche) et une nouvelle nomenclature a été proposée (2<sup>ème</sup> colonne en partant de la gauche).

# Annexe E

## Publications

### Article

**Lebenberg, J.** Herard, A.-S., Dubois, A., Dauguet, J., Frouin, V., Dhenain, M., Hantraye, P., Delzescaux, T., Jul 2010a. Validation of MRI-based 3D digital atlas registration with histological and autoradiographic volumes : an anatomofunctional transgenic mouse brain imaging study. *Neuroimage* 51 (3), 1037-1046.

### Conférences

**Lebenberg, J.** , Herard, A.-S., Dubois, A., Dhenain, M., Hantraye, P., Frouin, V., Delzescaux, T., April 18 - 24 2009a. Automated segmentation of 3D histological mouse brains using a MRI-based 3D digital atlas. In : Proc. 17th Scientific Meeting and Exhibithion of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Honolulu, Hawaii. p. 2885, Poster.

**Lebenberg, J.** , Herard, A. S., Dubois, A., Dhenain, M., Hantraye, P., Frouin, V., Delzescaux, T., June 28 - July 1 2009b. Segmentation of anatomo-functional 3D *post mortem* data using a MRI-based 3D digital atlas : Transgenic mouse brains study. In : Proc. IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro ISBI'09, Boston, USA. pp. 1182-1185, Oral presentation.

Herard, A. S. , Delzescaux, T., Cornet, S., **Lebenberg, J.**, Chabrier, P. E., Hantraye, P., Dhenain, M., 2009. Memory loss in young APPswe/PS1de9 mice and associated changes in brain metabolism analyzed using a 3d voxel-based approach. In : International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD'09), Vienna, Austria. p. 209, Poster.

Dubois, A. , Boisgard, R., Jego, B., **Lebenberg, J.**, Herard, A. S., Dollé, F., Lebon, V., Delzescaux, T., Tavitian, B., May 26 - 29 2010. *In vivo - post mortem* multimodal image registration in a rat glioma model. In : 5th European Molecular Imaging Meeting, Warsaw, Poland. p. 098, Poster (poster award).

**Lebenberg, J.** , Herard, A. S., Dubois, A., Dhenain, M., Hantraye, P., Delzescaux, T., August 31 - September 4 2010b. Automated indexation of metabolic changes in Alzheimer's mice using a voxel-wise approach combined to an MRI-based 3D digital atlas. In : Proc. 32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Buenos Aires, Argentina. pp. 5636-5639, Poster.

Delzescaux, T. , **Lebenberg, J.**, Raguet, H., Hantraye, P., Souedet, N., Gregoire, M., August 31 - September 4 2010. Segmentation of small animal PET/CT mouse brain scans using an MRI-based 3D digital atlas : Application in a neuroinflammation mouse model. In : Proc. 32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Buenos Aires, Argentina. pp. 3097-3100, Poster.

# Références bibliographiques

- Aggarwal, M., Zhang, J., Miller, M. I., Sidman, R. L., Mori, S., Sep 2009. Magnetic resonance imaging and micro-computed tomography combined atlas of developing and adult mouse brains for stereotaxic surgery. *Neuroscience* 162 (4), 1339–1350.
- Ali, A. A., Dale, A. M., Badea, A., Johnson, G. A., 2005. Automated segmentation of neuroanatomical structures in multispectral MR microscopy of the mouse brain. *Neuroimage* 27 (2), 425–435.
- Andreasen, A., Drewes, A., Assentoft, J., Larsen, N., Nielsen, H., Holm, I., Geneser, F., 1992. Computer-assisted three-dimensional reconstruction of the hippocampal region based on serial sections. *J Neurosci Methods* 37 (2), 151–160.
- Annese, J., Sforza, D. M., Dubach, M., Bowden, D., Toga, A. W., 2006. Postmortem high-resolution 3-dimensional imaging of the primate brain : blockface imaging of perfusion stained tissue. *Neuroimage* 30 (1), 61–69.
- Ashburner, J., Friston, K. J., 1999. Nonlinear spatial normalization using basis functions. *Hum Brain Mapp* 7 (4), 254–266.
- Ashburner, J., Friston, K. J., Jun 2000. Voxel-based morphometry—the methods. *Neuroimage* 11 (6 Pt 1), 805–821.
- Badea, A., Ali-Sharief, A. A., Johnson, G. A., Sep 2007. Morphometric analysis of the C57BL/6J mouse brain. *Neuroimage* 37 (3), 683–693.
- Badea, A., Johnson, G. A., Williams, R. W., May 2009. Genetic dissection of the mouse brain using high-field magnetic resonance microscopy. *Neuroimage* 45 (4), 1067–1079.
- Badea, A., Kostopoulos, G. K., Ioannides, A. A., Aug 2003. Surface visualization of electromagnetic brain activity. *J Neurosci Methods* 127 (2), 137–147.
- Bae, M. H., Pan, R., Wu, T., Badea, A., Jul 2009. Automated segmentation of mouse brain images using extended mrf. *Neuroimage* 46 (3), 717–725.
- Banati, R. B., Nov 2002. Visualising microglial activation in vivo. *Glia* 40 (2), 206–217.
- Bardinet, E., Cohen, L. D., Ayache, N., Jun 1996. Tracking and motion analysis of the left ventricle with deformable superquadrics. *Med Image Anal* 1 (2), 129–149.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate : a Pratical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical. Society B* 57 (1), 289–300.
- Bertrand, L., Nissanov, J., 2008. The neuroterrain 3d mouse brain atlas. *Front Neuroinformatics* 2, 3.

- Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., Canton, T., Jedidi, I., Gohin, M., Wirths, O., Bayer, T. A., Langui, D., Duyckaerts, C., Tremp, G., Pradier, L., Nov 2003. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* 184 (1), 247–263.
- Bock, N. A., Kovacevic, N., Lipina, T. V., Roder, J. C., Ackerman, S. L., Henkelman, R. M., 2006. *In vivo* magnetic resonance imaging and semiautomated image analysis extend the brain phenotype for cdf/cdf mice. *J Neurosci* 26 (17), 4455–4459.
- Boline, J., Lee, E.-F., Toga, A. W., Jul 2008. Digital atlases as a framework for data sharing. *Front Neurosci* 2 (1), 100–106.
- Boretius, S., Gadjanski, I., Demmer, I., Bähr, M., Diem, R., Michaelis, T., Frahm, J., Jun 2008. Mri of optic neuritis in a rat model. *Neuroimage* 41 (2), 323–334.
- Borgefors, G., September 1984. Distance transformations in arbitrary dimensions. *Computer Vision, Graphics and Image Processing* 27 (3), 321–345.
- Borgefors, G., 1986. Distance transformations in digital images. *Comput. Vision Graph. Image Process.* 34, 344–371.
- Brown, L. G., 1992. A survey of image registration techniques. *ACM Comput. Surv.* 24, 325–376.
- Brummer, M. E., Mersereau, R. M., Eisner, R. L., Lewine, R. J., 1993. Automatic detection of brain contours in mri data sets. *IEEE Trans Med Imaging* 12 (2), 153–166.
- Byrd, R. H., Lu, P., Nocedal, J., Zhu, C., 1995. A limited memory algorithm for bound constrained optimization. *SIAM Journal on Scientific Computing* 16, 1190–1208.
- Carson, J., Ju, T., Bello, M., Thaller, C., Warren, J., Kakadiaris, I. A., Chiu, W., Eichele, G., Feb 2010. Automated pipeline for atlas-based annotation of gene expression patterns : application to postnatal day 7 mouse brain. *Methods* 50 (2), 85–95.
- Casteels, C., Vermaelen, P., Nuyts, J., Linden, A. V. D., Baekelandt, V., Mortelmans, L., Bormans, G., Laere, K. V., 2006. Construction and evaluation of multitracer small-animal PET probabilistic atlases for voxel-based functional mapping of the rat brain. *J Nucl Med* 47 (11), 1858–1866.
- Chakravarty, M. M., Bertrand, G., Hodge, C. P., Sadikot, A. F., Collins, D. L., Apr 2006. The creation of a brain atlas for image guided neurosurgery using serial histological data. *Neuroimage* 30 (2), 359–376.
- Chan, E., Kovacevic, N., Ho, S. K. Y., Henkelman, R. M., Henderson, J. T., Jan 2007. Development of a high resolution three-dimensional surgical atlas of the murine head for strains 129s1/svimj and c57bl/6j using magnetic resonance imaging and micro-computed tomography. *Neuroscience* 144 (2), 604–615.
- Chen, X. J., Kovacevic, N., Lobaugh, N. J., Sled, J. G., Henkelman, R. M., Henderson, J. T., Jan 2006. Neuroanatomical differences between mouse strains as shown by high-resolution 3d mri. *Neuroimage* 29 (1), 99–105.
- Chiavaras, M. M., LeGoualher, G., Evans, A., Petrides, M., Mar 2001. Three-dimensional probabilistic atlas of the human orbitofrontal sulci in standardized stereotaxic space. *Neuroimage* 13 (3), 479–496.

- Cho, S., Li, Q., Ahn, S., Bai, B., Leahy, R. M., May 2007. Iterative image reconstruction using inverse fourier rebinning for fully 3-d pet. *IEEE Trans Med Imaging* 26 (5), 745–756.
- Collignon, A., Maes, F., Delaere, D., Vandermeulen, D., Suetens, P., Marchal, G., 1995. Automated multimodality image registration based on information theory. In : XIV<sup>th</sup> international conference on Information Processing in Medical Imaging (IPMI'95). Vol. 3. Kluwer Academic Publishers, pp. 263–274.
- Collins, D. L., Neelin, P., Peters, T. M., Evans, A. C., 1994. Automatic 3D intersubject registration of MR volumetric data in standardized Talairach space. *J Comput Assist Tomogr* 18 (2), 192–205.
- Commowick, O., 2007. Création et utilisation d'atlas anatomiques numériques pour la radiothérapie. Ph.D. thesis, Université de nice - Sophia Antipolis.
- Commowick, O., Arsigny, V., Isambert, A., Costa, J., Dhermain, F., Bidault, F., Bondiau, P.-Y., Ayache, N., Malandain, G., Aug 2008. An efficient locally affine framework for the smooth registration of anatomical structures. *Med Image Anal* 12 (4), 427–441.
- Coquillart, S., 1990. Extended free-form deformation : a sculpturing tool for 3D geometric modeling. In : SIGGRAPH '90 : Proceedings of the 17th annual conference on Computer graphics and interactive techniques. ACM, pp. 187–196.
- Dauguet, J., Jun. 2005. L'imagerie post mortem tridimensionnelle cérébrale : constitution et apport pour l'analyse conjointe de données histologiques anatomo-fonctionnelles et la mise en correspondance avec l'imagerie in vivo. Ph.D. thesis, École Centrale de Paris.
- Dauguet, J., Delzescaux, T., Condé, F., Mangin, J.-F., Ayache, N., Hantraye, P., Frouin, V., 2007. Three-dimensional reconstruction of stained histological slices and 3D non-linear registration with in-vivo MRI for whole baboon brain. *J Neurosci Methods* 164 (1), 191–204.
- Delatour, B., Guégan, M., Volk, A., Dhenain, M., Jun 2006. *In vivo* MRI and histological evaluation of brain atrophy in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 27 (6), 835–847.
- Delpierre, P., 2005. Pixscan : micro-scanner-CT insérable dans un microTEP. In : Présentation groupement de recherche 2917-Modélisation et Instrumentation pour l'Imagerie Biomédicale.
- Delzescaux, T., Dauguet, J., Condé, F., Maroy, R., Frouin, V., November 2003. Using 3D non rigid ffd-based method to register post mortem 3D histological data and in vivo MRI of a baboon brain. In : Ellis, R. E., Peters, T. M. (Eds.), *Medical image computing and computer-assisted intervention (MICCAI'03)*. Vol. 2879 of LNCS. Springer Verlag, Montreal, Canada, pp. 965–966.
- Delzescaux, T., Lebenberg, J., Raguette, H., Hantraye, P., Souedet, N., Gregoire, M., August 31 – September 4 2010. Segmentation of small animal PET/CT mouse brain scans using an MRI-based 3D digital atlas : Application in a neuroinflammation mouse model. In : *Proc. 32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Buenos Aires, Argentina. pp. 3097–3100, Poster.
- Deriche, R., Feb. 2-5 1987. Separable Recursive Filtering for Efficient Multi-Scale Edge Detection. In : *Proceeding International Workshop on Machine Vision and Machine Intelligence*. Tokyo, pp. 18–23.

- Desai, M. K., Sudol, K. L., Janelins, M. C., Mastrangelo, M. A., Frazer, M. E., Bowers, W. J., Jan 2009. Triple-transgenic alzheimer's disease mice exhibit region-specific abnormalities in brain myelination patterns prior to appearance of amyloid and tau pathology. *Glia* 57 (1), 54–65.
- Diallo, B., Dolidon, F., Travere, J. M., Mazoyer, B., 1998. Voxeline : a software program for 3d real-time visualization of biomedical images. *Comput Med Imaging Graph* 22 (4), 275–289.
- Dice, L. R., Jul 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26 (3), 297–302.
- Digabel, H., Lantuéjoul, C., 1978. Iterative algorithms. In : Chermant, J.-L. (Ed.), 2nd European Symposium on Quantitative Analysis of Microstructures in Material Science, Biology and Medicine. Riederer Verlag, Stuttgart FRG, pp. 85–99.
- Dorr, A., Sled, J. G., Kabani, N., May 2007. Three-dimensional cerebral vasculature of the cba mouse brain : a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *Neuroimage* 35 (4), 1409–1423.
- Dorr, A. E., Lerch, J. P., Spring, S., Kabani, N., Henkelman, R. M., Aug 2008. High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J mice. *Neuroimage* 42 (1), 60–69.
- Dubois, A., Boisgard, R., Jegou, B., Lebenberg, J., Hérard, A. S., Dollé, F., Lebon, V., Delzescaux, T., Tavitian, B., May 26 – 29 2010a. *In vivo - post mortem* multimodal image registration in a rat glioma model. In : Proc. 5th European Molecular Imaging Meeting, Warsaw, Poland. p. 098, Poster.
- Dubois, A., Dauguet, J., Herard, A.-S., Besret, L., Duchesnay, E., Frouin, V., Hantraye, P., Bonvento, G., Delzescaux, T., 2007. Automated three-dimensional analysis of histological and autoradiographic rat brain sections : application to an activation study. *J Cereb Blood Flow Metab* 27 (10), 1742–1755.
- Dubois, A., Dauguet, J., Souedet, N., Herard, A.-S., Riviere, D., Cointepas, Y., Bonvento, G., Hantraye, P., Frouin, V., Delzescaux, T., 2008a. BrainRAT : Brain Reconstruction and Analysis Toolbox. A freely available toolbox for the 3D reconstruction of anatomic-functional brain sections in rodents. In : the 38th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington, USA.
- Dubois, A., Herard, A.-S., Delatour, B., Hantraye, P., Bonvento, G., Dhenain, M., Delzescaux, T., Jun 2010b. Detection of significant changes in regional cerebral glucose uptake in APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease using voxel-wise statistical analysis. *Neuroimage* 51 (2), 586–598s.
- Dubois, A., Herard, A.-S., Flandin, G., Duchesnay, E., Besret, L., Frouin, V., Hantraye, P., Bonvento, G., Delzescaux, T., Apr 2008b. Quantitative validation of voxel-wise statistical analyses of autoradiographic rat brain volumes : application to unilateral visual stimulation. *Neuroimage* 40 (2), 482–494.
- Duyckaerts, C., Potier, M.-C., Delatour, B., Jan 2008. Alzheimer disease models and human neuropathology : similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115 (1), 5–38.
- Eickhoff, S. B., Heim, S., Zilles, K., Amunts, K., Aug 2006. Testing anatomically specified hypotheses in functional imaging using cytoarchitectonic maps. *Neuroimage* 32 (2), 570–582.

- Eickhoff, S. B., Stephan, K. E., Mohlberg, H., Grefkes, C., Fink, G. R., Amunts, K., Zilles, K., May 2005. A new spm toolbox for combining probabilistic cytoarchitectonic maps and functional imaging data. *Neuroimage* 25 (4), 1325–1335.
- Evans, A. C., Marrett, S., Torrescorzo, J., Ku, S., Collins, L., Mar 1991. MRI-PET correlation in three dimensions using a volume-of-interest (VOI) atlas. *J Cereb Blood Flow Metab* 11 (2), A69–A78.
- Feki, A., Teboul, O., A.Dubois, Bozon, B., Faure, A., Hantraye, P., Dhenain, M., Delatour, B., Delzescaux, T., 2007. A fully automated and adaptive detection of amyloid plaques in stained brain sections of alzheimer transgenic mice. In : The 10th international conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI'07), Brisbane, Australia. Brisbane.
- Fontaine, R., Trétraukt, M., Bélanger, F., Viscogliosi, N., Bérard, P., Cadorette, J., Leroux, J., Michaud, J., Pratte, J.-F., Pepin, C., Robert, S., Lecomte, R., 2003. Preliminary results of a data acquisition sub-system for distributed, digital, computational, APD-based, dual-modality PET/CT architecture for small animal imaging. In : IEEE Nucl. Sci. Symp. Conf. Record.
- Frackowiak, R., Friston, K., Frith, C., Dolan, R., Price, C., Zeki, S., Ashburner, J., Penny, W., 2003. *Human Brain Function*, 2nd Edition. Academic Press.
- Friston, K., Ashburner, J., Kiebel, S., Nichols, T., Penny, W., 2007. *Statistical Parametric Mapping : The Analysis of Functional Brain Images*.
- Friston, K. J., Frith, C. D., Liddle, P. F., Frackowiak, R. S., 1991. Comparing functional PET images : the assessment of significant change. *J Cereb Blood Flow Metab* 11 (4), 690–699.
- Friston, K. J., Holmes, A. P., Poline, J. B., Grasby, P. J., Williams, S. C., Frackowiak, R. S., Turner, R., 1995. Analysis of fMRI time-series revisited. *Neuroimage* 2 (1), 45–53.
- Geman, S., Geman, D., November 1984. Stochastic relaxation, gibbs distributions and the bayesian restoration of images. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 6 (6), 721–741.
- Genovese, C. R., Lazar, N. A., Nichols, T., Apr 2002. Thresholding of statistical maps in functional neuroimaging using the false discovery rate. *Neuroimage* 15 (4), 870–878.
- Gerig, G., Jomier, M., Chakos, M., 2001. Valmet : A new validation tool for assessing and improving 3D object segmentation. In : *Medical image computing and computer-assisted intervention*. Vol. 2208 of LNCS. Springer, pp. 516–523.
- Guézic, A., Ayache, N., 1994. Smoothing and matching of 3-D space curves. *Int. J. Comput. Vision* 12 (1), 79–104.
- Hajnal, J. V., Saeed, N., Soar, E. J., Oatridge, A., Young, I. R., Bydder, G. M., 1995. A registration and interpolation procedure for subvoxel matching of serially acquired mr images. *J Comput Assist Tomogr* 19 (2), 289–296.
- Hammer, B., 1990. NMR-PET scanner apparatus. U.S. Patent Number 4 (939), 464.
- Hammer, B. E., Christensen, N. L., Heil, B. G., 1994. Use of a magnetic field to increase the spatial resolution of positron emission tomography. *Med Phys* 21 (12), 1917–1920.

- Haralick, R., Shapiro, L., January 1985. Image segmentation techniques. *Comput. Vis. Graph. Image Proc.* 29 (1), 100–132.
- Hardy, J., Apr 1997. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 20 (4), 154–159.
- Herard, A. S., Delzescaux, T., Cornet, S., Lebenberg, J., Chabrier, P. E., Hantraye, P., Dhenain, M., 2009. Memory loss in young appsw/ps1de9 mice and associated changes in brain metabolism analyzed using a 3d voxel-based approach. In : *International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD'09)*, Vienna, Austria. p. 209, Poster.
- Hess, A., Lohmann, K., Gundelfinger, E., Scheich, H., 1998. A new method for reliable and efficient reconstruction of 3-dimensional images from autoradiographs of brain sections. *J Neurosci Methods* 84 (1-2), 77–86.
- Höhne, K. H., Hanson, W. A., 1992. Interactive 3d segmentation of mri and ct volumes using morphological operations. *J Comput Assist Tomogr* 16 (2), 285–294.
- Hibbard, L., Hawkins, R., 1988. Objective image alignment for three-dimensional reconstruction of digital autoradiograms. *J .Neurosci. Methods* 26 (1), 55–74.
- Hjornevik, T., Leergaard, T. B., Darine, D., Moldestad, O., Dale, A. M., Willoch, F., Bjaalie, J. G., 2007. Three-dimensional atlas system for mouse and rat brain imaging data. *Front Neuroinformatics* 1, 4.
- Horowitz, S., Pavlidis, T., 1975. Picture segmentation by a directed split-and-merge procedure. Tech. rep., Department of Electrical Engineering, Princeton University.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G., Oct 1996. Correlative memory deficits, abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274 (5284), 99–102.
- Hudson, H. M., Larkin, R. S., 1994. Accelerated image reconstruction using ordered subsets of projection data. *IEEE Trans Med Imaging* 13 (4), 601–609.
- Hume, S. P., Gunn, R. N., Jones, T., 1998. Pharmacological constraints associated with positron emission tomographic scanning of small laboratory animals. *Eur J Nucl Med* 25 (2), 173–176.
- Huttenlocher, D. P., Klanderman, G. A., Rucklidge, W. A., 1993. Comparing Images Using the Hausdorff Distance. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 15 (9), 850–863.
- Imafuku, I., Masaki, T., Waragai, M., Takeuchi, S., Kawabata, M., Hirai, S., Ohno, S., Nee, L. E., Lippa, C. F., Kanazawa, I., Imagawa, M., Okazawa, H., Oct 1999. Presenilin 1 suppresses the function of c-jun homodimers via interaction with qm/jif-1. *J Cell Biol* 147 (1), 121–134.
- Iqbal, K., Alonso, A. D., Gondal, J. A., Gong, C. X., Haque, N., Khatoon, S., Sengupta, A., Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I., 2000. Mechanism of neurofibrillary degeneration and pharmacologic therapeutic approach. *J Neural Transm Suppl* 59, 213–222.
- Jaccard, P., 1901. Distribution de la flore alpine dans le bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 37, 241–272.
- Jaccard, P., 1912. The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytologist* 11 (2), 37–50.

- Jack, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Shaw, L. M., Aisen, P. S., Weiner, M. W., Petersen, R. C., Trojanowski, J. Q., Jan 2010. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 9 (1), 119–128.
- Jankowsky, J. L., Savonenko, A., Schilling, G., Wang, J., Xu, G., Borchelt, D. R., Sep 2002. Transgenic mouse models of neurodegenerative disease : opportunities for therapeutic development. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2 (5), 457–464.
- Johnson, G. A., Ali-Sharief, A., Badea, A., Brandenburg, J., Cofer, G., Fubara, B., Gewalt, S., Hedlund, L. W., Upchurch, L., Aug 2007. High-throughput morphologic phenotyping of the mouse brain with magnetic resonance histology. *Neuroimage* 37 (1), 82–89.
- Johnson, G. A., Cofer, G. P., Gewalt, S. L., Hedlund, L. W., Mar 2002. Morphologic phenotyping with mr microscopy : the visible mouse. *Radiology* 222 (3), 789–793.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Müller-Hill, B., 1987. The precursor of alzheimer's disease amyloid a4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325 (6106), 733–736.
- Kass, M., Witkin, A., Terzopoulos, D., 1988. Snakes : Active contour models. *International Journal of Computer Vision* 1 (4), 321–331.
- Kemp, B. J., Hruska, C. B., McFarland, A. R., Lenox, M. W., Lowe, V. J., Apr 2009. Nema nu 2-2007 performance measurements of the siemens inveon preclinical small animal pet system. *Phys Med Biol* 54 (8), 2359–2376.
- Kim, B., Boes, J., Frey, K., Meyer, C., 1997. Mutual information for automated unwarping of rat brain autoradiographs. *NeuroImage* 5, 31–40.
- Knafo, S., Venero, C., Merino-Serrais, P., Fernaud-Espinosa, I., Gonzalez-Soriano, J., Ferrer, I., Santpere, G., DeFelipe, J., Sep 2009. Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of alzheimer's disease. *J Pathol* 219 (1), 41–51.
- Kovacević, N., Henderson, J. T., Chan, E., Lifshitz, N., Bishop, J., Evans, A. C., Henkelman, R. M., Chen, X. J., May 2005. A three-dimensional mri atlas of the mouse brain with estimates of the average and variability. *Cereb Cortex* 15 (5), 639–645.
- Lancaster, J. L., Woldorff, M. G., Parsons, L. M., Liotti, M., Freitas, C. S., Rainey, L., Kochunov, P. V., Nickerson, D., Mikiten, S. A., Fox, P. T., Jul 2000. Automated talairach atlas labels for functional brain mapping. *Hum Brain Mapp* 10 (3), 120–131.
- Lau, C., Ng, L., Thompson, C., Pathak, S., Kuan, L., Jones, A., Hawrylycz, M., 2008a. Exploration and visualization of gene expression with neuroanatomy in the adult mouse brain. *BMC Bioinformatics* 9, 153.
- Lau, J. C., Lerch, J. P., Sled, J. G., Henkelman, R. M., Evans, A. C., Bedell, B. J., May 2008b. Longitudinal neuroanatomical changes determined by deformation-based morphometry in a mouse model of alzheimer's disease. *Neuroimage*.
- Lebenberg, J., Hérard, A.-S., Dubois, A., Dauguet, J., Frouin, V., Dhenain, M., Hantraye, P., Delzescaux, T., Jul 2010a. Validation of MRI-based 3D digital atlas registration with histological and autoradiographic volumes : an anatomofunctional transgenic mouse brain imaging study. *Neuroimage* 51 (3), 1037–1046.

- Lebenberg, J., Hérard, A. S., Dubois, A., Dhenain, M., Hantraye, P., Delzescaux, T., August 31 – September 4 2010b. Automated indexation of metabolic changes in Alzheimer's mice using a voxel-wise approach combined to an MRI-based 3D digital atlas. In : Proc. 32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Buenos Aires, Argentina. pp. 5636–5639, Poster.
- Lebenberg, J., Hérard, A.-S., Dubois, A., Dhenain, M., Hantraye, P., Frouin, V., Delzescaux, T., April 18 – 24 2009a. Automated segmentation of 3D histological mouse brains using a MRI-based 3D digital atlas. In : Proc. 17th Scientific Meeting and Exhibition of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Honolulu, Hawaii. p. 2885, Poster.
- Lebenberg, J., Hérard, A. S., Dubois, A., Dhenain, M., Hantraye, P., Frouin, V., Delzescaux, T., June 28 – July 1 2009b. Segmentation of anatomo-functional 3D *post mortem* data using a MRI-based 3D digital atlas : Transgenic mouse brains study. In : Proc. IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro ISBI '09, Boston, USA. pp. 1182–1185, Oral presentation.
- Lecoeur, J., Barillot, C., 2007. Segmentation d'images cérébrales : État de l'art. Research Report RR-6306, INRIA.
- Lee, E.-F., Jacobs, R. E., Dinov, I., Leow, A., Toga, A. W., 2005a. Standard atlas space for C57BL/6J neonatal mouse brain. *Anat Embryol (Berl)* 210 (4), 245–263.
- Lee, J., Ahn, S.-H., Lee, D., Oh, S., Kim, C., Jeong, J., Park, K., Chung, J.-K., Lee, M., 2005b. Voxel-based statistical analysis of cerebral glucose metabolism in the rat cortical deafness model by 3D reconstruction of brain from autoradiographic images. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32 (6), 696–701.
- Lee, S., Wolberg, G., Shin, S. Y., 1997. Scattered data interpolation with multilevel b-splines. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics* 3 (3), 228–244.
- Lehericy, S., Bardinet, E., Tremblay, L., de Moortele, P.-F. V., Pochon, J.-B., Dormont, D., Kim, D.-S., Yelnik, J., Ugurbil, K., Feb 2006. Motor control in basal ganglia circuits using fmri and brain atlas approaches. *Cereb Cortex* 16 (2), 149–161.
- Li, X., Yankeelov, T. E., Rosen, G. D., Gore, J. C., Dawant, B. M., Apr 2009. Enhancement of histological volumes through averaging and their use for the analysis of magnetic resonance images. *Magn Reson Imaging* 27 (3), 401–416.
- Liang, H., Yang, Y., Yang, K., Wu, Y., Boone, J. M., Cherry, S. R., 2007. A microPET/CT system for in vivo small animal imaging. *Phys Med Biol* 52 (13), 3881–3894.
- Lucas, A. J., Hawkes, R. C., Ansorge, R. E., Williams, G. B., Nutt, R. E., Clark, J. C., Fryer, T. D., Carpenter, T. A., 2006. Development of a combined microPET-MR system. *Technol Cancer Res Treat* 5 (4), 337–341.
- Lunsford, L. D. (Ed.), 1988. *Modern Stereotactic Neurosurgery*. Boston : Martinus Nijhoff.
- Ma, Y., Hof, P. R., Grant, S. C., Blackband, S. J., Bennett, R., Slatest, L., McGuigan, M. D., Benveniste, H., 2005. A three-dimensional digital atlas database of the adult C57BL/6J mouse brain by magnetic resonance microscopy. *Neuroscience* 135 (4), 1203–1215.

- Ma, Y., Smith, D., Hof, P. R., Foerster, B., Hamilton, S., Blackband, S. J., Yu, M., Benveniste, H., 2008. *In Vivo* 3D Digital Atlas Database of the Adult C57BL/6J Mouse Brain by Magnetic Resonance Microscopy. *Front Neuroanat* 2, 1.
- MacKenzie-Graham, A., Jones, E. S., Shattuck, D. W., Dinov, I. D., Bota, M., Toga, A. W., 2003. The informatics of a c57bl/6j mouse brain atlas. *Neuroinformatics* 1 (4), 397–410.
- Mackenzie-Graham, A., Lee, E.-F., Dinov, I. D., Bota, M., Shattuck, D. W., Ruffins, S., Yuan, H., Konstantinidis, F., Pitiot, A., Ding, Y., Hu, G., Jacobs, R. E., Toga, A. W., 2004. A multimodal, multidimensional atlas of the C57BL/6J mouse brain. *J Anat* 204 (2), 93–102.
- MacKenzie-Graham, A., Tinsley, M. R., Shah, K. P., Aguilar, C., Strickland, L. V., Boline, J., Martin, M., Morales, L., Shattuck, D. W., Jacobs, R. E., Voskuhl, R. R., Toga, A. W., Sep 2006. Cerebellar cortical atrophy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimage* 32 (3), 1016–1023.
- MacQueen, J. B., 1967. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In : Cam, L. M. L., Neyman, J. (Eds.), *Proceedings of 5th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*. Vol. 1. University of California Press, pp. 281–297.
- Maes, F., Collignon, A., Vandermeulen, D., Marchal, G., Suetens, P., 1997. Multimodality image registration by maximization of mutual information. *IEEE Trans. Med. Imaging* 16 (2), 187–198.
- Mahalanobis, P. C., April 1936. On the generalised distance in statistics. In : *Proceedings National Institute of Science, India*. Vol. 2. pp. 49–55.
- Maheswaran, S., Barjat, H., Bate, S. T., Aljabar, P., Hill, D. L. G., Tilling, L., Upton, N., James, M. F., Hajnal, J. V., Rueckert, D., Feb 2009a. Analysis of serial magnetic resonance images of mouse brains using image registration. *Neuroimage* 44 (3), 692–700.
- Maheswaran, S., Barjat, H., Rueckert, D., Bate, S. T., Howlett, D. R., Tilling, L., Smart, S. C., Pohlmann, A., Richardson, J. C., Hartkens, T., Hill, D. L. G., Upton, N., Hajnal, J. V., James, M. F., May 2009b. Longitudinal regional brain volume changes quantified in normal aging and Alzheimer’s APP/PS1 mice using MRI. *Brain Res* 1270, 19–32.
- Maintz, J., Viergever, M., 1998. A survey of medical image registration. *Medical Image Analysis* 2 (1), 1–36.
- Malandain, G., Bardinet, E., Nelissen, K., Vanduffel, W., 2004. Fusion of autoradiographs with an MR volume using 2-D and 3-D linear transformations. *NeuroImage* 23 (1), 111–127.
- Maldjian, J. A., Laurienti, P. J., Kraft, R. A., Burdette, J. H., Jul 2003. An automated method for neuroanatomic and cytoarchitectonic atlas-based interrogation of fmri data sets. *Neuroimage* 19 (3), 1233–1239.
- Mangin, J. F., Frouin, V., Bloch, I., Bendriem, B., Lopez-Krahe, J., Sep 1994. Fast non-supervised 3d registration of pet and mr images of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 14 (5), 749–762.
- Marsden, P. K., Strul, D., Keevil, S. F., Williams, S. C. R., Cash, D., 2002. Simultaneous PET and NMR. *Br J Radiol* 75 Spec No, S53–S59.

- Martone, M. E., Gupta, A., Ellisman, M. H., May 2004. E-neuroscience : challenges and triumphs in integrating distributed data from molecules to brains. *Nat Neurosci* 7 (5), 467–472.
- Masliah, E., Feb 2008. Neuropathology : Alzheimer’s in real time. *Nature* 451 (7179), 638–639.
- Mattes, D., Haynor, D., Vesselle, H., Lewellen, T., Eubank, W., 2003. PET-CT image registration in the chest using free-form deformations. *IEEE Trans Med Imaging* 22.
- Medeiros, R., Baglietto-Vargas, D., Laferla, F. M., Jun 2010. The role of tau in alzheimer’s disease and related disorders. *CNS Neurosci Ther.*
- Mével, K., Desgranges, B., Baron, J.-C., Landeau, B., la Sayette, V. D., Viader, F., Eustache, F., Chételat, G., Aug 2007. Detecting hippocampal hypometabolism in mild cognitive impairment using automatic voxel-based approaches. *Neuroimage* 37 (1), 18–25.
- Miller, R. G., 1981. *Simultaneous Statistical Inference*, 2nd Edition. Springer Verlag, New York.
- Morris, R. G. M., 1981. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 12 (2), 239–260.
- Morrow, T. J., Paulson, P. E., Danneman, P. J., Casey, K. L., Apr 1998. Regional changes in forebrain activation during the early and late phase of formalin nociception : analysis using cerebral blood flow in the rat. *Pain* 75 (2-3), 355–365.
- Nguyen, P., Holschneider, D., Maarek, J., Yang, J., Mandelkern, M., 2004. Statistical parametric mapping applied to an autoradiographic study of cerebral activation during treadmill walking in rats. *NeuroImage* 23 (1), 252–9.
- Nikou, C., Heitz, F., Nehlig, A., Namer, I., Armspach, J., 2003. A robust statistics-based global energy function for the alignment of serially acquired autoradiographic sections. *J Neurosci Methods* 124 (1), 93–102.
- Ourselin, S., Roche, A., Subsol, G., Pennec, X., Ayache, N., 2001. Reconstructing a 3D structure from serial histological sections. *Image and Vision Computing* 19 (1-2), 25–31.
- Pain, F., Dhenain, M., Gurden, H., Routier, A. L., Lefebvre, F., Mastroioppo, R., Lanière, P., Oct 2008. A method based on monte carlo simulations and voxelized anatomical atlases to evaluate and correct uncertainties on radiotracer accumulation quantitation in beta microprobe studies in the rat brain. *Phys Med Biol* 53 (19), 5385–5404.
- Palombi, O., Shin, J.-W., Watson, C., Paxinos, G., 2006. Neuroanatomical affiliation visualization-interface system. *Neuroinformatics* 4 (4), 299–317.
- Paulson, P. E., Wiley, J. W., Morrow, T. J., Dec 2007. Concurrent activation of the somatosensory forebrain and deactivation of periaqueductal gray associated with diabetes-induced neuropathic pain. *Exp Neurol* 208 (2), 305–313.
- Paxinos, G., Franklin, K., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, CL.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney.

- Paxinos, G., Watson, C., 2005. The Rat Brain in Stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego.
- Pennec, X., 1996. L'incertitude dans les problèmes de reconnaissance et de recalage – applications en imagerie médicale et biologie moléculaire. Ph.D. thesis, Ecole Polytechnique.
- Petiet, A., Bertrand, A., Wiggins, C.-J., Petit, F., Houitte, D., Debeir, T., Rooney, T., Hantraye, P., Dhenain, M., 2010. Gadolinium-stained brains reveal amyloid plaques in live Alzheimer's transgenic mice. In : Proc. 18th Scientific Meeting and Exhibition of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Stockholm, Sweden.
- Pham, D. L., Xu, C., Prince, J. L., 2000. Current methods in medical image segmentation. *Annu Rev Biomed Eng* 2, 315–337.
- Poldrack, R. A., Mar 2007. Region of interest analysis for fmri. *Soc Cogn Affect Neurosci* 2 (1), 67–70.
- Powell, M. J. D., January 1964. An efficient method for finding the minimum of a function of several variables without calculating derivatives. *The Computer Journal* 7 (2), 155–162.
- Prima, S., Ourselin, S., Ayache, N., 2002. Computation of the mid-sagittal plane in 3D brain images. *IEEE Transaction on Medical Imaging* 21 (2), 122–138.
- Purger, D., McNutt, T., Achanta, P., Quiñones-Hinojosa, A., Wong, J., Ford, E., Nov 2009. A histology-based atlas of the C57BL/6J mouse brain deformably registered to *in vivo* MRI for localized radiation and surgical targeting. *Phys Med Biol* 54 (24), 7315–7327.
- Raylman, R. R., Majewski, S., Lemieux, S. K., Velan, S. S., Kross, B., Popov, V., Smith, M. F., Weisenberger, A. G., Zorn, C., Marano, G. D., 2006. Simultaneous MRI and PET imaging of a rat brain. *Phys Med Biol* 51 (24), 6371–6379.
- Redwine, J. M., Kosofsky, B., Jacobs, R. E., Games, D., Reilly, J. F., Morrison, J. H., Young, W. G., Bloom, F. E., Feb 2003. Dentate gyrus volume is reduced before onset of plaque formation in pdapp mice : a magnetic resonance microscopy and stereologic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (3), 1381–1386.
- Reiman, E. M., Uecker, A., Gonzalez-Lima, F., Minear, D., Chen, K., Callaway, N. L., Berndt, J. D., Games, D., 2000. Tracking Alzheimer's disease in transgenic mice using fluorodeoxyglucose autoradiography. *Neuroreport* 11 (5), 987–991.
- Rivière, D., Regis, J., Cointepas, Y., Papadopoulos-Orfanos, D., Cachia, A., Mangin, J.-F., 2003. A freely available anatomist/ brainvisa package for structural morphometry of the cortical sulci. In : *Human Brain Mapping*. p. 934.
- Roche, A., February 2001. Recalage d'images médicales par inférence statistique. Thèse de sciences, Université de Nice Sophia-Antipolis.
- Roche, A., Malandain, G., Pennec, X., Ayache, N., 1998. The correlation ratio as a new similarity measure for multimodal image registration. In : *MICCAI '98 : Proceedings of the First International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*. Springer-Verlag, London, UK, pp. 1115–1124.

- Rosen, G. D., Porte, N. T. L., Diechtiareff, B., Pung, C. J., Nissanov, J., Gustafson, C., Bertrand, L., Gefen, S., Fan, Y., Tretiak, O. J., Manly, K. F., Park, M. R., Williams, A. G., Connolly, M. T., Capra, J. A., Williams, R. W., 2003. Informatics center for mouse genomics : the dissection of complex traits of the nervous system. *Neuroinformatics* 1 (4), 327–342.
- Rosenfeld, A., Pfaltz, J. L., 1966. Sequential operations in digital picture processing. *J. ACM* 13 (4), 471–494.
- Rousseeuw, P., Leroy, A., 1987. *Robust Regression and Outlier Detection*. Series in Applied Probability and Statistics. Wiley-Interscience, New York, 329 pages.
- Rubins, D. J., Melega, W. P., Lacan, G., Way, B., Plenevaux, A., Luxen, A., Cherry, S. R., 2003. Development and evaluation of an automated atlas-based image analysis method for microPET studies of the rat brain. *Neuroimage* 20 (4), 2100–2118.
- Rucklidge, W., 1996. *Efficient visual recognition using the Hausdorff distance*. Vol. 1173. Springer Verlag, 178 p.
- Rueckert, D., Sonoda, L. I., Hayes, C., Hill, D. L., Leach, M. O., Hawkes, D. J., 1999. Nonrigid registration using free-form deformations : application to breast MR images. *IEEE Trans Med Imaging* 18 (8), 712–721.
- Sadowski, M., Pankiewicz, J., Scholtzova, H., Ji, Y., Quartermain, D., Jensen, C. H., Duff, K., Nixon, R. A., Gruen, R. J., Wisniewski, T., May 2004. Amyloid-beta deposition is associated with decreased hippocampal glucose metabolism and spatial memory impairment in APP/PS1 mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 63 (5), 418–428.
- Sawiak, S. J., Wood, N. I., Williams, G. B., Morton, A. J., Carpenter, T. A., Jan 2009. Voxel-based morphometry in the R6/2 transgenic mouse reveals differences between genotypes not seen with manual 2D morphometry. *Neurobiol Dis* 33 (1), 20–27.
- Scheenstra, A. E. H., van de Ven, R. C. G., van der Weerd, L., van den Maagdenberg, A. M. J. M., Dijkstra, J., Reiber, J. H. C., 2009. Automated segmentation of *in vivo* and *ex vivo* mouse brain magnetic resonance images. *Mol Imaging* 8 (1), 35–44.
- Schormann, T., Dabringhaus, A., Zilles, K., 1995. Statistics of deformations in histology and application to improved alignment with MRI. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 14, 25–35.
- Schweinhardt, P., Fransson, P., Olson, L., Spenger, C., Andersson, J. L. R., 2003. A template for spatial normalisation of MR images of the rat brain. *J Neurosci Methods* 129 (2), 105–113.
- Sederberg, T. W., Parry, S. R., 1986. Free-form deformation of solid geometric models. *SIGGRAPH Comput. Graph.* 20 (4), 151–160.
- Sethian, J. A., 1999. Fast marching methods. *SIAM Rev.* 41 (2), 199–235.
- Sharief, A. A., Badea, A., Dale, A. M., Johnson, G. A., Jan 2008. Automated segmentation of the actively stained mouse brain using multi-spectral MR microscopy. *Neuroimage* 39 (1), 136–145.
- Sharief, A. A., Johnson, G. A., Oct 2006. Enhanced t2 contrast for mr histology of the mouse brain. *Magn Reson Med* 56 (4), 717–725.

- Shattuck, D. W., Leahy, R. M., Jun 2002. Brainsuite : an automated cortical surface identification tool. *Med Image Anal* 6 (2), 129–142.
- Shattuck, D. W., MacKenzie-Graham, A., Toga, A. W., 2004. DUFF : Software Tools for Visualization and Processing of Neuroimaging Data. In : Proc. IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro ISBI '04. pp. 644–647.
- Streicher, J., Weninger, W. J., Müller, G. B., 1997. External marker-based automatic congruencing : a new method of 3D reconstruction from serial sections. *Anat Rec* 248 (4), 583–602.
- Swanson, L., 1998. Brain maps : structure of the rat brain. 2nd Revised Edition. Elsevier Science, Amsterdam.
- Talairach, J., Tournoux, P., January 1988. Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain : 3-Dimensional Proportional System : An Approach to Cerebral Imaging. Thieme Medical Publishers.
- Ter-Pogossian, M. M., Phelps, M. E., Hoffman, E. J., Mullani, N. A., Jan 1975. A positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (pett). *Radiology* 114 (1), 89–98.
- Terzopoulos, D., Fleischer, K., 1988. Deformable Models. *The Visual Computer* 4 (6), 306–331.
- Thirion, J.-P., 1996. New feature points based on geometric invariants for 3D image registration. *Int. J. Comput. Vision* 18 (2), 121–137.
- Toga, A. W., Samaie, M., Payne, B. A., Feb 1989. Digital rat brain : a computerized atlas. *Brain Res Bull* 22 (2), 323–333.
- Tzourio-Mazoyer, N., Landeau, B., Papathanassiou, D., Crivello, F., Etard, O., Delcroix, N., Mazoyer, B., Joliot, M., Jan 2002. Automated anatomical labeling of activations in SPM using a macroscopic anatomical parcellation of the MNI MRI single-subject brain. *Neuroimage* 15 (1), 273–289.
- Valla, J., Chen, K., Berndt, J. D., Gonzalez-Lima, F., Cherry, S. R., Games, D., Reiman, E. M., May 2002. Effects of image resolution on autoradiographic measurements of posterior cingulate activity in pdapp mice : implications for functional brain imaging studies of transgenic mouse models of alzheimer's disease. *Neuroimage* 16 (1), 1–6.
- Valla, J., Schneider, L., Reiman, E. M., Oct 2006. Age- and transgene-related changes in regional cerebral metabolism in PSAPP mice. *Brain Res* 1116 (1), 194–200.
- Viola, P., Wells, W. M., 1997. Alignment by maximization of mutual information. *International Journal of Computer Vision* 24, 137–154.
- Vyazovskiy, V. V., Cirelli, C., Tononi, G., Tobler, I., Mar 2008. Cortical metabolic rates as measured by 2-deoxyglucose-uptake are increased after waking and decreased after sleep in mice. *Brain Res Bull* 75 (5), 591–597.
- Watanabe, H., Andersen, F., Simonsen, C. Z., Evans, S. M., Gjedde, A., Cumming, P., Group, D. S., Nov 2001. MR-based statistical atlas of the Göttingen minipig brain. *Neuroimage* 14 (5), 1089–1096.
- Wesson, D. W., Levy, E., Nixon, R. A., Wilson, D. A., Jan 2010. Olfactory dysfunction correlates with amyloid-beta burden in an alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci* 30 (2), 505–514.

- Wong, P. C., Cai, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., Jul 2002. Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 5 (7), 633–639.
- Woods, R. P., Grafton, S. T., Holmes, C. J., Cherry, S. R., Mazziotta, J. C., 1998a. Automated image registration : I. general methods and intrasubject, intramodality validation. *J Comput Assist Tomogr* 22 (1), 139–152.
- Woods, R. P., Grafton, S. T., Watson, J. D., Sicotte, N. L., Mazziotta, J. C., 1998b. Automated image registration : Ii. intersubject validation of linear and nonlinear models. *J Comput Assist Tomogr* 22 (1), 153–165.
- Worsley, K., Marrett, S., Neelin, P., Vanda, A., Friston, K., Evans, A., 1996. A unified statistical approach for determining significant signals in images of cerebral activation. *Human Brain Mapping* 4, 58–73.
- Yelnik, J., Bardinet, E., Dormont, D., François, C., Tandé, D., Parain, C., Malandain, G., Ayache, N., Hirsch, E., Agid, Y., 2003. Delineation of the basal ganglia in mr images of patients by automatic registration of a multimodal atlas based on histological and mr data. In : *NeuroImage (HBM'03)*. New York, USA.
- Yelnik, J., Bardinet, E., Dormont, D., Malandain, G., Ourselin, S., Tandé, D., Karachi, C., Ayache, N., Cornu, P., Agid, Y., 2007. A three-dimensional, histological and deformable atlas of the human basal ganglia. I. Atlas construction based on immunohistochemical and MRI data. *Neuroimage* 34 (2), 618–638.
- Zhao, W., Young, T., Ginsberg, M., 1993. Registration and three-dimensional reconstruction of autoradiographic images by the disparity analysis. *IEEE Trans Med Imaging* 12 (4), 782–791.
- Zijdenbos, A. P., Dawant, B. M., Margolin, R. A., Palmer, A. C., 1994. Morphometric analysis of white matter lesions in MR images : method and validation. *IEEE Trans Med Imaging* 13 (4), 716–724.
- Zucker, S., September 1976. Region growing : Childhood and adolescence. *Computer Graphics, Image Processing* 5 (3), 382–399.

---

## Automatisation et optimisation de l'analyse d'images anatomo-fonctionnelles de cerveaux de souris par atlas numérique 3D

**Résumé** La résolution des images de cerveau du petit animal acquises *in vivo* est encore limitée au regard de la taille des structures observées. Les modalités d'imagerie *post mortem* (coupes histologiques et autoradiographiques) restent encore aujourd'hui la référence pour une étude anatomo-fonctionnelle précise, bien que la cohérence 3D de l'organe soit perdue. Ces images 2D étant analysées par segmentation manuelle de régions d'intérêt (RDI), ce qui requiert du temps et une expertise en neuroanatomie, le nombre de coupes et de RDI étudiées est limité. Pour s'affranchir de la perte de la cohérence 3D de l'organe et traiter un grand nombre de données, il est nécessaire de reconstruire des images 3D à partir de séries de coupes 2D et d'automatiser et d'optimiser l'analyse de ces volumes de données. Des travaux ont été réalisés pour restaurer la cohérence 3D de l'organe. L'objectif atteint de ce travail de thèse a donc été de proposer une méthode d'analyse de ces images 3D. Pour cela, nous avons recalé un atlas numérique 3D sur des images 3D de cerveaux de souris pour mener une étude de celles-ci grâce aux RDI de l'atlas. L'analyse par atlas à l'échelle des RDI, bien que fiable et rapide, met difficilement en évidence des variations fonctionnelles se produisant dans des zones de petite dimension par rapport à la taille des RDI. Ces différences peuvent en revanche apparaître grâce à une analyse statistique réalisée à l'échelle du pixel. L'interprétation de ces résultats étant complexe chez la Souris, nous avons proposé d'utiliser l'atlas pour superviser cette analyse afin de coupler les avantages des méthodes. Un travail préliminaire a ensuite été réalisé pour évaluer la faisabilité d'analyser par atlas des images TEP acquises chez la Souris. Une perspective de ces travaux est d'utiliser l'atlas numérique 3D comme outil unique pour analyser conjointement des images acquises *in vivo* et *post mortem* sur les mêmes sujets et ainsi recouper les informations extraites de ces images.

**Mots clefs** Traitement d'images biomédicales, Recalage d'images multimodales, Atlas de cerveau de souris, Analyse par régions d'intérêt, Analyse statistique, Histologie, Autoradiographie.

---

## Automation and optimization of the anatomo-functional images analysis of the mouse brain using a 3D digital atlas

**Abstract** Murine models are commonly used in neuroscience to improve our knowledge of disease processes and to test drug effects. To accurately study neuroanatomy and brain function in small animals, histological staining and *ex vivo* autoradiography remain the gold standards to date. However, the 3D spatial consistency of the structure is lost. The analyses are classically performed by manually tracing regions of interest, which is time-consuming. For this reason, only a few 2D tissue sections are usually processed, resulting in a loss of information. To consider more data and overcome the issue of the loss of the 3D spatial consistency of the studied organ, we used numerous serial sections to obtain a spatially consistent 3D reconstruction of the brain. To automatize and optimize the analysis of these data, we proposed to match a 3D digital atlas with 3D-reconstructed *post mortem* data to automatically evaluate morphology and function in mouse brain structures. However, this approach may mislead functional variation between groups if the concerned areas are small compared to the size of the segmentations. To detect this variation, a voxel-wise approach can be performed. Results from this kind of analysis realized in a small animal study are nevertheless complex to understand. We then proposed to automatically supervise the voxel-wise approach using the 3D digital atlas. A preliminary work was also realized to evaluate the feasibility to analyze PET mouse brain images using the digital atlas. One future prospect of these works is using a single tool, the 3D digital atlas, to analyze *post mortem* and *in vivo* data acquired on same subjects and then compare results obtained from all images.

**Keywords** Biological image processing, Multimodal image registration, Mouse brain atlas, Region of interest analysis, Voxel-wise analysis, Histochemistry, Autoradiography.

---

**Spécialité** Physique - Traitement et analyse d'images biomédicales

---

**Laboratoires d'accueil** Laboratoire des Maladies Neurodégénératives.  
CEA/DSV/I<sup>2</sup>BM/SHFJ, 4 place du général Leclerc, 91401 Orsay Cedex, France.  
CEA/DSV/I<sup>2</sup>BM/MIRCen URA CEA-CNRS 2210, 18 route du panorama, 92265 Fontenay Aux Roses Cedex, France.

---