



HAL
open science

Imagerie fonctionnelle ultrasonore du système nerveux central: des entrées dans le SNC jusqu'aux fonctions cognitives complexes chez le rat et chez le primate non humain

Julien Claron

► **To cite this version:**

Julien Claron. Imagerie fonctionnelle ultrasonore du système nerveux central: des entrées dans le SNC jusqu'aux fonctions cognitives complexes chez le rat et chez le primate non humain. Médecine humaine et pathologie. Université Paris sciences et lettres, 2021. Français. NNT : 2021UPSL044 . tel-03296408

HAL Id: tel-03296408

<https://pastel.hal.science/tel-03296408>

Submitted on 22 Jul 2021

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

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



THÈSE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'ESPCI Paris, Laboratoire de Physique pour la Médecine Paris
Inserm U1273

**Imagerie fonctionnelle ultrasonore du système nerveux
central :
Des entrées dans le SNC jusqu'aux fonctions cognitives
complexes chez le rat et le primate non-humain**

Soutenue par

Julien Claron

Le 12 Mars 2021

Ecole doctorale n° 391

**Sciences mécaniques,
acoustique, électronique et
robotique**

Spécialité

Acoustique

Composition du jury :

Serge, PICAUD Professeur, Institut de la Vision	<i>Président</i>
Carine, KARACHI Maître de Conférence - Praticien Hospitalier, Institut du Cerveau	<i>Rapportrice</i>
Suliann, BEN HAMED Directrice de Recherche Institut des Sciences Cognitives Marc Jeannerod	<i>Rapportrice</i>
Emmanuel, BOSSY Professeur, Université Grenoble-Alpes	<i>Examineur</i>
Thomas, DEFFIEUX Chargé de Recherche, ESPCI Paris	<i>Examineur</i>
Pierre, POUGET Chargé de Recherche, Institut du Cerveau	<i>Examineur</i>
Mickaël, TANTER Directeur de Recherche, ESPCI Paris	<i>Directeur de thèse</i>

Remercîments

Je souhaite tout d'abord remercier sincèrement ceux qui m'ont encadré pendant cette thèse : Mickaël, Pierre, Thomas et Sophie.

Mickaël, merci pour ton indéfectible soutien. Merci de m'avoir proposé, il y a maintenant trois ans et demi, une thèse au sein de ton laboratoire. Ton enthousiasme débordant pour la recherche est communicatif et m'a permis de me découvrir un véritable intérêt pour l'imagerie. Merci pour ton soutien tant scientifique que moral au cours de ces trois ans, ainsi que de m'avoir fait confiance pour continuer les travaux sur le primate.

Pierre, sans toi, je n'aurais jamais découvert les joies de la primatologie. Merci de m'avoir encadré sur cet aspect de ma thèse, de m'avoir appris avec une patience infinie l'électrophysiologie, alors que je n'y connaissais rien à mon arrivée à l'ICM. Ta grande disponibilité et ta patience pour répondre à mes questions les plus naïves m'ont été d'une grande aide tout au long de ces trois années. Les « singeologues », pour reprendre ton néologisme, sont des gens vraiment extraordinaires, et je suis heureux de compter désormais parmi leurs rangs.

Thomas, merci l'aide que tu m'as apportée en ce qui concerne les ultrasons durant cette thèse. Tes conseils précieux m'ont permis de mieux comprendre les tenants et les aboutissants de ce qui m'était demandé. Tu m'as apporté une stimulation intellectuelle d'une grande importance par ton regard plus neuf sur la biologie et l'électrophysiologie, ce qui m'a permis de mieux comprendre ce que j'étais moi-même en train de faire.

Sophie, merci de m'avoir accepté en master 2 il y a maintenant près de quatre ans pour un travail sur la moelle épinière, qui a conduit, finalement, à la thèse que je termine aujourd'hui. Sans toi, rien de tout cela n'aurait pu avoir lieu, et je te suis à ce titre éternellement redevable. Ta gentillesse, ta patience et ta disponibilité pour répondre à mes questions m'ont été d'une grande aide.

Merci beaucoup à Mesdames Karachi et Ben Hamed, ainsi qu'à Messieurs Picaud et Bossy d'avoir accepté d'être membres de mon jury et d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à mes « co-bureaux », Line tout d'abord, avec qui j'ai commencé cette thèse, et Marta ensuite, avec qui je la termine. Line, j'ai apprécié travailler avec toi, merci d'avoir eu la patience de m'encadrer quand j'ai commencé mon M2. Ton aide fut précieuse et d'une grande utilité.

Marta, merci pour ton soutien moral, ce ne fut pas tous les jours faciles, mais j'ai trouvé, au-delà d'une collègue de travail, une véritable amie. Merci d'avoir été présente quand le moral n'était pas au beau fixe, de m'avoir écouté râler, pester, et autres verbes dont la teneur ne serait être acceptable au sein de ces remerciements. Merci d'avoir été là. Merci pour tout.

Merci à toute l'équipe de Physique pour la Médecine,

Patricia, pour ta gentillesse et ton aide. Sans toi, le labo fonctionnerait probablement moins bien. Merci pour tes gâteaux, tes cookies (ceux avec les petits raisins dedans), et les poches de gel stérile.

Nathalie, merci pour ton aide à l'animalerie et en « manip », sans toi, beaucoup de ces dernières n'auraient pas été possibles.

Merci à Florian, Olivier, à l'ex-membre du labo et grand manitou de la pizza Jérôme, à Flora, David (même si « la Neptune calzonée », on ne valide pas), et tous ceux de la pizza du jeudi, j'ai été ravi de partager ces moments avec vous.

Mafalda, je te remercie d'avoir été là pendant ces trois ans, nos discussions ont toujours été intéressantes et m'ont aidé d'un point de vue tant scientifique que moral.

Hicham, merci pour ta gentillesse, pour le fameux concours de pâtisserie, pour ton aide sur tout ce qui concerne l'impression 3D et le design de pièce. J'ai conscience de t'en avoir parfois beaucoup demandé, mais tu as toujours été présent et disponible.

Je remercie finalement tous mes co-thésards, tous les post-docs et tous les permanents du laboratoire, avec qui j'ai pu partager des moments de convivialité pendant ces trois ans, vous avez fait de ce laboratoire le lieu vivant et agréable qu'il est aujourd'hui.

Merci à tous ceux qui m'ont encadré, aidé, appris la « singeologie » à l'ICM.

Merci à toi, Julie, de m'avoir aidé à gérer mes deux animaux à quatre mains, notamment pendant toute la période de rédaction de ce manuscrit. Sans toi, tout ce travail n'aurait pas été possible. Merci également de m'avoir tenu compagnie dans le box du -3, pendant que Guss et Secundo travaillaient.

Merci Estelle et Morgane pour votre brillante gestion de l'animalerie. Vous faites tout votre possible pour que nous puissions faire nos recherches dans les meilleures conditions possibles. Merci aussi pour les bons moments passés avec vous en dehors du -3, tant aux pauses repas qu'aux barbecues.

Merci Bénédicte, Lucile et Bodgan pour les soins apportés à nos petits protégés, vous veillez au bien-être de nos animaux.

Merci Coraline, Sophie, Alexandre, et tout le personnel de zootechnie de gérer la logistique journalière de nos animaux. Merci de vous être occupées de nourrir Secundo et Guss quand je ne pouvais pas le faire.

Merci Pierre T., pour ton aide précieuse pour le design des pièces et l'ingénierie. Tu nous as aidés à mettre au point un bon nombre de systèmes chez le singe et toujours avec le sourire.

Merci Maxime, Elodie et Farah pour votre temps, votre aide, tant au -3 qu'en-dehors, ce furent véritablement d'agréables moments passés en votre compagnie.

De l'Institut de la Vision, mes remerciements vont tout d'abord à Fabrice : tu m'as appris, avec Harry, les rudiments de la primatologie. Merci pour ta patience infinie durant les chirurgies, pour tes conseils avisés sur les figures des articles et les articles en général, pour avoir pris soins de mes animaux pendant le premier confinement. Je ne pourrais jamais assez te remercier pour ton aide et le partage de tes connaissances.

Je remercie aussi Matthieu et Ruben, qui m'ont aidé à prendre soin de mes animaux, avec qui j'ai pu discuter, échanger, partager.

Et finalement, hors du laboratoire, je tiens pour commencer à remercier Matthieu et Matthieu, pour leurs conseils respectivement en littérature et en philosophie.

Je tiens à remercier Rémi et Olivier pour leurs conseils avisés sur le déroulement d'une thèse, vous êtes déjà passés par là, et c'est maintenant mon tour. Merci à Mily, partenaire sportive, coach surmotivée. Merci Karine pour m'avoir écouté parler quand j'en avais besoin.

Merci à Guillaume, Angel, Glenn, et les autres, de m'avoir supporté dans les derniers moments de la thèse, votre soutien moral fut d'une grande aide.

Enfin , merci à toute ma famille, et mes parents et ma sœur, pour commencer :merci d'avoir été là pour m'aider pendant ces trois ans et demi. Merci d'avoir pris le temps de vous intéresser à ce que je fais, même si ce n'est pas forcément votre domaine. Merci de vous être enquis de ma santé et de mes recherches, merci d'avoir été là pendant la rédaction de ce manuscrit, de l'avoir relu, de l'avoir commenté. Il est certain que je ne pourrais jamais assez vous remercier.

Merci, de même, à mes grands-parents. Merci d'avoir posé la question « Comment ils vont tes singes ? » tous les dimanches quand je vous téléphone, merci de m'avoir écouté quand j'avais des soucis, merci d'avoir été là, tout simplement.

Pour finir, merci à Guss et à Secundo : sans vous, pas de thèse. Vous ne lirez sans doute pas ces lignes, très probablement parce que vous êtes des macaques rhésus et qu'à ce titre, vous ne savez pas lire (je n'ai pas réussi à vous l'apprendre). Vous avez été des compagnons de thèse admirables, et je ne saurai vous remercier assez pour vos fiers et loyaux services. J'espère humblement avoir été un bon responsable et expérimentateur, et avoir su prendre aussi soin

Résumé

Ces travaux de thèse portent sur les applications de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS) à l'étude de phénomènes neurovasculaires chez le rat et le primate non-humain, notamment à l'étude des entrées dans le système nerveux central et à l'intégration de l'information par les centres supérieurs de la cognition. Contrairement à l'échographie standard telle qu'utilisée en routine dans les examens médicaux, l'imagerie fUS est sensible aux très petits flux sanguins et par l'intermédiaire du couplage neurovasculaire aux activations fonctionnelles. Elle nous a permis, dans un premier temps, l'étude de l'intégration par la moelle épinière du message nociceptif en provenance en système nerveux périphérique. Nous avons mis en avant la possibilité d'imager les réponses hémodynamiques dues à une activité neuronale dans la corne dorsale de la moelle épinière, allant de la réponse mécanique tactile à la stimulation nociceptive. Par ailleurs, nous avons, pour la première fois, déterminé la fonction de réponse hémodynamique dans la moelle et montré que la réponse neurovasculaire est un mécanisme NMDA-dépendant dans la corne dorsale de cette dernière. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'intégration de l'information, non pas chez le rat mais chez le primate non-humain, durant une tâche oculomotrice cognitive en imageant un plan fronto-médian du cortex. Dans ce plan d'imagerie, nous avons montré que les champs oculomoteurs supplémentaires (COS), zone importante de la supervision des tâches cognitives oculomotrices chez le primate, sont liés au système nerveux autonome, notamment en ce qui concerne la mesure de la motivation et de l'engagement cognitif dans une tâche. En effet, nous observons, à la fois dans le signal Doppler issu des COS et dans le diamètre de la pupille après la réalisation de la tâche oculomotrice, une diminution de l'intensité du signal fortement corrélés entre la pupille et le COS, suggérant que ce dernier possède un rôle dans le suivi et le maintien de l'attention chez le primate. Finalement, dans le même plan d'imagerie, nous avons pu imager le cortex cingulaire antérieur (CCA) et son rôle dans l'expression de la volonté dans le libre-arbitre. Chez le primate non-humain. Le CCA est en effet connu pour jouer un rôle important dans la résolution des conflits ou la gestion des émotions, et nous proposons aujourd'hui un rôle de ce dernier dans l'expression de la volonté, notamment à la reprise volontaire d'une tâche après une pause, dans la libre-disposition de soi-même. Nous proposons, dans cette thèse, une dernière partie d'ouverture, sur la mesure couplée entre l'imagerie fonctionnelle ultrasonore et l'électrophysiologie. L'intérêt majeur des mesures couplées réside dans la capacité de mesurer directement l'activité neuronale locale mais aussi la réponse hémodynamique qui en découle, nous permettant de lier la réponse neuronale à la réponse vasculaire. Ces travaux mettent en avant l'utilité de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore dans l'étude de mécanismes neuronaux et cognitifs complexes et ont permis d'étendre la compréhension des mécanismes neurovasculaires.

Summary

This thesis focuses on the applications of ultrafast ultrasound functional imaging (fUS) to the study of neurovascular phenomena in rats and non-human primates, in particular to the study of inputs into the central nervous system and the integration of information by higher centers of cognition. In contrast to standard ultrasound as routinely used in medical examinations, fUS imaging is sensitive to very small blood flows and *via* neurovascular coupling to functional activations.. fUS imaging has allowed us, in a first step, to study the integration by the spinal cord of the nociceptive message coming from the peripheral nervous system. We highlighted the possibility of imaging the hemodynamic responses due to neuronal activity in the dorsal horn of the spinal cord, ranging from the tactile mechanical response to nociceptive stimulation. Also, we have, for the first time, determined the hemodynamic response function in the spinal cord and shown that the neurovascular response is an NMDA-dependent mechanism in the dorsal horn of the spinal cord. In a second step, we investigated the integration of information, not in the rat but the non-human primate, during a cognitive oculomotor task by imaging a fronto-medial plane of the cortex. In this imaging plane, we have shown that the supplementary eye fields (SEF), an important area of supervision of oculomotor cognitive tasks in the primate, is related to the autonomous nervous system, particularly concerning the measurement of motivation and cognitive engagement in a task. Indeed, we observe, both in the Doppler signal from SEF and the pupil diameter after the oculomotor task is completed, a decrease in the intensity of the signal strongly correlated between the pupil and the SEF, suggesting that the latter has a role in monitoring and maintaining attention in primates. Finally, in the same imaging plane, we were able to image the anterior cingulate cortex (ACC) and its role in the expression of will in free will in the non-human primate. Indeed, the anterior cingulate cortex is known to play an important role in the resolution of conflicts or the management of emotions, and we propose today a role of the anterior cingulate cortex in the expression of the will, in particular in the voluntary resumption of a task after a break, in the free will of the self. In this thesis, we propose an opening part, on the coupled measurement between ultrasound functional imaging and electrophysiology. The major interest of coupled measurements lies in the ability to directly measure local neuronal activity but also the resulting hemodynamic response, allowing us to link the neuronal response to the vascular response. This work highlights the usefulness of functional ultrasound imaging in the study of complex neuronal and cognitive mechanisms and has enabled us to extend our understanding of neurovascular mechanisms.

Table des matières

Chapitre 1. Introduction.....	13
1.1. Historique des recherches en neurosciences.....	14
1.2. Développement du système nerveux et physiologie de l'activité cérébrale	18
1.2.1. Structure et fonction cérébrale.....	18
1.2.2. Mise en place du système nerveux chez les embryons de mammifères	19
1.2.3. Anatomie comparée du cerveau : des rongeurs aux primates	21
1.2.4. Glie et neurones : étude de la composition d'un cerveau	24
1.2.5. Le neurone : activité neuronale électrique et chimique	28
1.2.6. Activité vasculaire induite : couplage neurovasculaire	33
1.3. Techniques d'exploration de l'activité cérébrale : historique et descriptif.	35
1.3.1. Electrophysiologie	36
1.3.2. Electro-encéphalographie (EEG) et électro-corticographie (ECoG)	36
1.3.3. Magnétoencéphalographie (MEG).....	37
1.3.4. Near InfraRed Spectroscopy (NIRS).....	38
1.3.5. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM ou MRI).....	39
1.3.6. Tomographie par émission de positon (TEP-scan ou PET-scan).....	43
1.3.7. Tomodensitométrie (CT-Scan).....	44
1.3.8. Imagerie Ultrasonore	44
1.4. Imagerie Fonctionnelle Ultrasonore.....	44
1.4.1. Principe de l'échographie	45
1.4.2. Effet Doppler	46
1.4.3. Echographie ultrarapide	48
1.4.4. Sommation cohérente.....	50
1.4.5. Filtrage des signaux ultrasonores.....	51
1.4.6. Imagerie fonctionnelle ultrasonore.....	54
1.5. Objectifs de la thèse	57
1.5.1. Imagerie fonctionnelle ultrasonore de la moelle épinière.....	57
1.5.2. Imagerie fonctionnelle des champs oculomoteurs supplémentaires chez le primate non- humain.....	58
1.5.3. Couplage de deux techniques de mesure de l'activité cérébrale : fUS et électrophysiologie.	61
1.6. Bibliographie du chapitre	62
Chapitre 2. Imagerie fonctionnelle de la moelle épinière chez le rat.....	69
2.1. Introduction.....	69
2.2. Neurophysiologie de la somesthésie.....	70

2.2.1. Sensibilité non nociceptive.....	70
2.2.2. La sensibilité nociceptive.....	78
2.3. Matériel et Méthodes	80
2.4. Résultats.....	88
2.4.1. Anatomie vasculaire de la moelle épinière	88
2.4.2. Activations fonctionnelles de la moelle épinière induites par des stimulations mécaniques naturelles.....	91
2.4.3. Stimulation électrique de la moelle épinière	93
2.4.4. Imagerie d'une allodynie inflammatoire induite.....	100
2.5. Discussion et conclusion.....	101
2.5.1. Activations fonctionnelles dans la moelle épinière du rat.....	102
2.5.2. Activation fonctionnelle pathologique dans la moelle épinière	103
2.5.3. Vers une imagerie bimodale de la moelle épinière.....	104
2.6. Bibliographie du chapitre	105
Chapitre 3. Imagerie fonctionnelle des champs oculomoteurs supplémentaires chez le primate non-humain	117
3.1. Introduction.....	119
3.1.1. Genèse des mouvements oculomoteurs.....	121
3.1.2. Contrôle cortical des mouvements de saccade.....	123
3.1.3. Champ oculomoteur supplémentaire (COS)	126
3.1.4. Cortex Cingulaire Antérieur (CCA)	128
3.1.5. Pupille et effort cognitif.....	131
3.1.6. Imagerie fonctionnelle ultrasonore chez le primate non-humain	131
3.2. Matériel et Méthodes	133
3.3. L'activité des champs oculomoteurs supplémentaires est un reflet de l'effort cognitif	137
3.3.1. Introduction.....	137
3.3.2. Résultats	139
3.3.3. Discussion et conclusion.....	151
3.4. Bibliographie du chapitre	154
Chapitre 4. Imagerie fonctionnelle de la volonté chez le primate non-humain dans le cortex cingulaire antérieur	161
4.1. Notions sur la volonté	162
4.1.1. Introduction.....	162
4.1.2. Idées sur la volonté chez les penseurs grecs.....	163
4.1.3. Idées sur la volonté chez Descartes	163
4.1.4. Idées sur la volonté chez Schopenhauer	164
4.1.5. Idées sur la volonté chez Nietzsche.....	164

4.2. Notions sur le libre-arbitre	165
4.2.1. Définition	165
4.2.2. Eléments sur la liberté d'indifférence	166
4.2.3. Idées sur le déterminisme de Spinoza.....	166
4.2.4. Libre-arbitre et neurosciences	167
4.3. Le cortex cingulaire antérieur est responsable de la partie volontaire du libre arbitre dans la reprise d'une tâche motrice	170
4.3.1. Introduction.....	170
4.3.2. Matériel et Méthodes	173
4.3.3. Résultats	173
4.3.4. Discussion	183
4.4. Bibliographie du chapitre	185
Chapitre 5. Ouverture sur l'enregistrement de l'activité électrophysiologique et de l'activité vasculaire par imagerie ultrasonore.....	187
5.1. Introduction.....	188
5.1.1. Technique du couplage fUS / Electrophysiologie.....	189
5.1.2. Intérêt du couplage entre le fUS et l'électrophysiologie	190
5.1.3. Investigation neurophysiologique du signal IRMf (N.K. Logothetis, 2001)	191
5.2. Matériel et méthodes.....	195
5.3. Résultats préliminaires	195
5.3.1. Localisation <i>in vivo</i> de la pointe de la microélectrode	195
5.3.2. Enregistrements couplés fUS / électrophysiologie	196
5.3.3. Découplage neurovasculaire entre la tâche et l'activité fUS.	198
5.4. Discussion et conclusion.....	202
5.5. Bibliographie du chapitre	203
Chapitre 6. Conclusion générale	205

Glossaire

ACC	: Cortex Cingulaire Anterieur (Anterior Cingulate Cortex)
AMPA(R)	: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (receptor)
ANM	: Activité de neurones multiples
ATP	: Adénosine triphosphate
AUN	: Activité d'un unique neurone
BOLD	: Blood oxygen-level dependant
EAAT	: Excitatory aminoacid transporter
ECoG	: Electrocorticographie
EEG	: Electroencéphalographie
EPSP	: Potentiel postsynaptique excitateur (Excitatory PostSynaptic Potential)
¹⁸ FDG	: Fluorodexoxyglucose marqué au fluor 18
fUS	: functional Ultrasound
GABA	: acide γ -aminobutyrique
Hb	: desoxyhémoglobine
HbO	: oxyhémoglobine
ICA	: Independent composant analysis
IPSP	: Potentiel postsynaptique inhibiteur (Inhibitory PostSynaptic Potential)
IRM	: Imagerie par résonance magnétique (MRI)
KAR	: Kainic acid receptor
LFP	: Potentiel de champ local (Local Field Potential)
MEG	: Magnétoencéphalographie
MUA	: Activité d'unités multiples (multiunit activity)
NIRS	: Spectroscopie de proche infrarouge (Near infrared spectroscopy)
NMDA	: N-methyl-D-aspartate receptor
PCL	: Potentiels de champs locaux (voir LFP)

PET	: Tomographie par émission de positon (Positon emission tomography)
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
SEF	: Supplementary Eye Field
SQUID	: Superconductive Quantum Interference Device
SUA	: Activité d'unité seule (Single unit activity)
Sv	: Sievert
UNV	: Unité neurovasculaire

Chapitre 1. Introduction

Dans l'introduction de ce manuscrit, que nous essayerons d'être le plus accessible possible, nous commencerons par un bref historique de l'histoire des neurosciences et des recherches dans lesquelles celui-ci s'inscrit, avant de s'intéresser plus en particulier au système nerveux central et aux moyens de l'étudier.

Une seconde partie, plus portée sur la biologie, parlera de généralités sur le système nerveux central, en passant de sa mise en place au cours du développement embryonnaire, à l'anatomie comparée entre nos différents modèles et l'être humain ou encore à la composition cellulaire du cerveau et au fonctionnement d'un neurone pour finir sur le couplage neurovasculaire, mécanisme fondamental permettant d'avoir un accès indirect à l'activité métabolique et donc neuronale dans le cerveau.

Finalement, une troisième partie sera, elle, plus portée sur l'aspect physique des techniques d'imageries du système nerveux central, et comportera un historique des méthodes qui ont permis d'accéder à l'activité neuronale, avant de s'intéresser plus en profondeur à l'imagerie fonctionnelle ultrasonore, technique d'imagerie prépondérante dans ce manuscrit.

1.1. Historique des recherches en neurosciences

L'histoire des neurosciences, entendons par là l'étude du cerveau, commence très probablement dès le 15^{ème} siècle avant notre ère avec un papyrus égyptien dit *Papyrus Edwin Smith*. Traité de guerre où sont décrits divers traumatismes, blessures et maladies ainsi que la manière de les traiter, il s'agit de l'un des premiers ouvrages « scientifiques » mentionnant le cerveau, noté « moelle du crâne ».

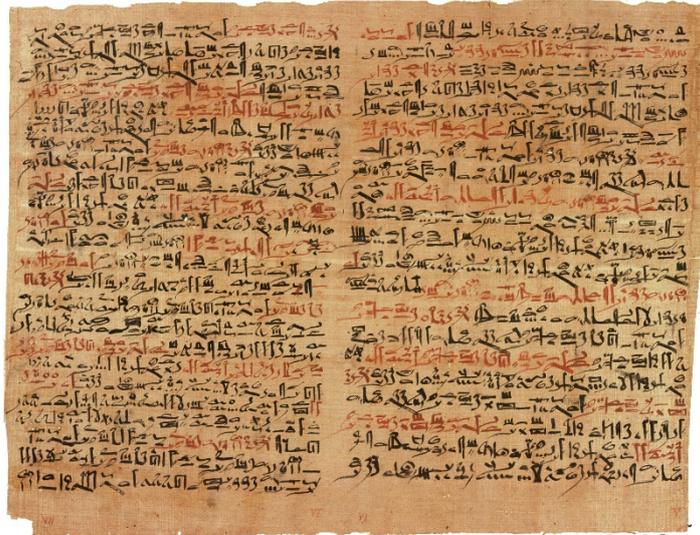


Figure 1. Papyrus Edwin Smith – 15^{ème} siècle avant J.C.

Le développement des neurosciences continue sur le sous-continent européen, durant la seconde partie du dernier millénaire avant J.C., où deux visions majoritaires s'opposent quant au rôle du cerveau. D'un côté, les pythagoriciens dont Alcmeon de Croton (VI^{ème} siècle avant J.C.) puis Hippocrate (V^{ème} siècle avant J.C.) placent l'esprit, l'intellect au sein du cerveau¹ alors qu'à l'opposé, Aristote place l'esprit dans le cœur et définit le cerveau comme un simple régulateur de la chaleur du sang.

Ces visions co-existent pendant quelques siècles, où, dans les premiers siècles après J.C., l'histoire des neurosciences est illustrée par Claude Galien qui explore le rôle du cerveau chez les mammifères par dissection de nombreuses espèces. Le cerveau est alors le centre du *psychikon* (*pneuma* psychique en opposition au *pneuma physikon* et au *pneuma zotikon*), source des nerfs sensitifs et moteurs (où Galien déterminera la présence de sept paires de nerfs crâniens²) alors que le cœur devient source du *zotikon*, source de

la chaleur du corps³ et le foie la source du *physikon*, source du sang et de la nutrition du corps^a.

A la fin du premier millénaire, c'est en Asie mineure que les neurosciences progressent, notamment avec les chirurgiens arabes Al-Zahrawi⁴ ou Ibn Sina⁵ qui décrivent diverses pathologies de la tête et du système nerveux central, autant physiques (contusions, blessures) que psychiques.

Au moment de la renaissance italienne, de Luzzi et de Vigevano sont les précurseurs de l'anatomie humaine grâce à la dissection de cadavres humains, suivi par Léonard de Vinci notamment sur l'œil, son architecture et sa fonction⁶. André Vésale, anatomiste célèbre de cette période, détermine un grand nombre de structures neuro-anatomiques qu'il décrit pour la première fois en 1538 dans *Tabulae anatomicae sex*⁶ et en 1543, il décrit la moelle épinière et la base du tronc cérébral dans *De humani corporis fabrica*. Il publiera les planches anatomiques la même année.

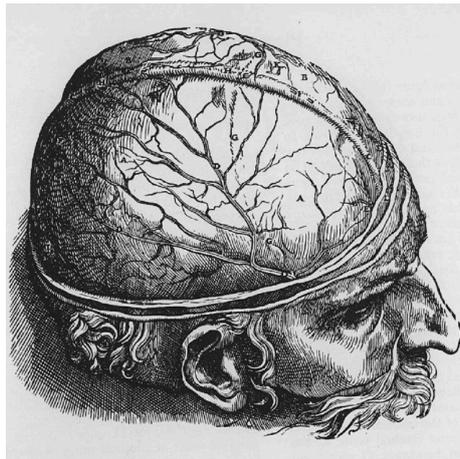


Figure 2. Première figure du septième livre de *De humani corporis Fabrica* (A. Vesalius, 1543) présentant une tête humaine ouverte de façon à montrer le cerveau.

Au XVII^{ème} siècle, le médecin anglais Thomas Willis continue l'étude de l'anatomie du cerveau, qu'il publie en 1664 dans *Cerebri anatome*. Il étudie notamment la vascularisation du cerveau et donnera son nom au cercle d'artères situé à la base du cerveau : le polygone de Willis. Dans les années suivantes, Willis publie un ouvrage sur

^a <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02145067/document>

la physiologie et la physiopathologie du cerveau, notamment sur les origines de l'épilepsie et pose les bases de la psychiatrie dans *Pathologicae cerebri et nervosi generis specimen*.

Aux alentours des années 1800, l'anatomiste allemand Sömmering détermine et classe les douze paires de nerfs crâniens dans une classification toujours utilisée aujourd'hui², le physicien italien Galvani publie dans *De viribus electricitatis in motu musculari* sa célèbre expérience sur les cuisses de grenouilles où il met en évidence le rôle de l'électricité dans le système nerveux⁷.

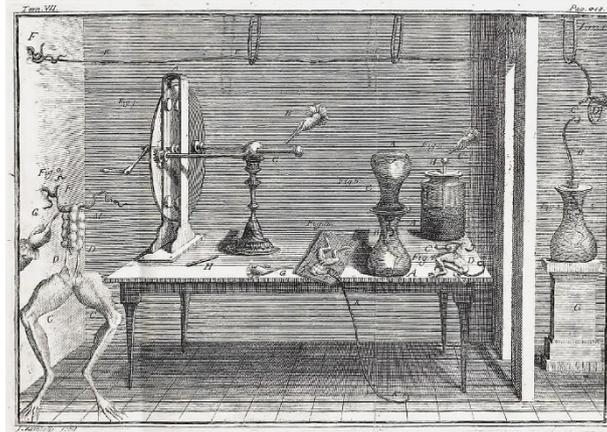


Figure 3. Expérience de Galvani mettant en évidence le rôle de l'électricité dans le système nerveux - 1792

En 1861, Paul Broca, étudiant alors des patients atteints d'aphasie (perte partielle ou totale des capacités d'expression), lie une zone du cerveau, située dans le cortex préfrontal, à la maîtrise du langage. Cette aire porte aujourd'hui le nom *d'aire de Broca*.

Les travaux de Broca ne se limitent pas à la physiopathologie du système nerveux central, il est aussi un précurseur dans le domaine de la neuroimagerie, inventeur de la première technique d'imagerie cérébrale : la couronne thermométrique de Broca⁸, basée sur l'hypothèse qu'il existerait des variations de températures liées à des variations d'activités cérébrales. Cette technique d'imagerie fonctionnelle fut cependant rapidement abandonnée à cause de son imprécision et des difficultés de la mettre en œuvre.

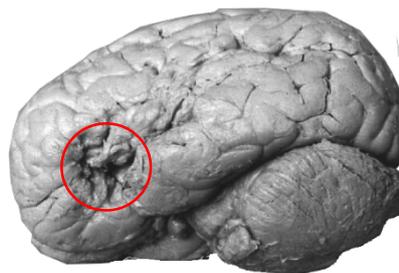


Figure 4. Photo du cerveau du patient de Broca, avec l'aire abimée portant son nom - 1861

En 1906, Golgi et Ramon y Cajal reçoivent le prix Nobel de Médecine⁹ pour leurs observations des cellules de Purkinje chez le pigeon, et la mise en évidence, par Ramon y Cajal, de l'existence des synapses entre les neurones par une technique de coloration cellulaire par l'argent.

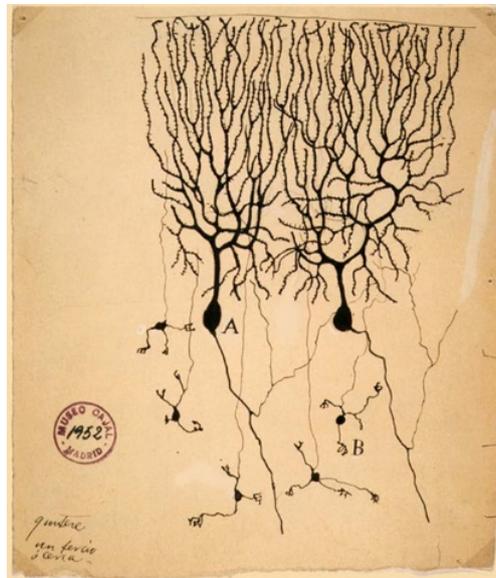


Figure 5. Cellule de Purkinje chez le pigeon, dessin par Ramon y Cajal - 1905

Au cours du XX^{ème} siècle, de nombreuses techniques d'imagerie comme les rayons X basés sur les travaux de Röntgen ou l'électrophysiologie sur les travaux de Hodgkin et Huxley, ont vu le jour. Les recherches en neurosciences s'enrichissent alors de ces techniques, qui permettent une compréhension de plus en plus fine du système nerveux central, de son anatomie, de son fonctionnement, de ses pathologies, et de données *in vivo*, et permettent de faire un lien fort entre les structures et les fonctions du système nerveux central, lien que nous explorerons dans ce manuscrit, tant au niveau de la moelle épinière qu'au niveau du cerveau.

La relation forte existante entre la structure, dans notre cas, celle du système vasculaire cérébral et la fonction, étudiée à travers la structure et expression d'une action, activité ou sensation soulève de nombreux questionnements sur le lien entre les structures et les fonctions, notamment sur les modifications structurelles (ici induite par le couplage neurovasculaire) résultantes de la fonction d'une aire cérébrale et les liens à court et long terme existant entre les deux. Nous pouvons aussi nous demander s'il existe des différences dans le lien entre structure et fonction entre un cas d'étude physiologique et un cas d'étude pathologique ou encore comment s'exprime la volonté dans le cerveau.

La structure est l'une des composantes du cerveau des plus facilement accessible, notamment car on peut y avoir accès de façon non invasive (par imagerie par résonance magnétique nucléaire, e.g.) et permet d'avoir accès à la fonction. Dans notre cas, même si l'on perd le côté non invasif, l'étude de la structure nous permet d'avoir accès à un panel large de fonctions en simultané et nous donne accès à un grand nombre de paramètres physiologique sur le traitement de l'information par le cerveau.

Dans cette introduction, nous commencerons par étudier la structure, notamment par le développement et la mise en place du système nerveux central chez l'embryon puis nous dériverons sur les fonctions du système nerveux central, avant de nous intéresser aux outils qui vont permettre l'étude de ce lien entre structure et fonction, après une étude plus détaillée sur l'imagerie fonctionnelle ultrasonore, technique principale de ce manuscrit.

1.2. Développement du système nerveux et physiologie de l'activité cérébrale

L'embranchement phylogénétique des mammifères permet d'explorer la façon dont la structure du système nerveux central et périphérique se met en place ainsi que ses différentes fonctions. Le rat de laboratoire *rattus norvegicus*, tout comme le macaque rhésus *macaca mulatta*, les deux modèles utilisés dans les études de ce manuscrit, ou bien encore l'être humain *homo sapiens* sont des métazoaires triploblastiques cordés épineuriens : ce sont des organismes multicellulaires, dont la gastrulation de la blastula produit 3 feuillets distincts et qui possèdent une notocorde située sur la partie dorsale de l'animal.

L'étude de la mise en place générale du système nerveux central chez l'embryon permet de se poser les questions suivantes : « qu'est-ce que le système nerveux central et périphérique ? » et « de quoi est-il composé ? »

1.2.1. Structure et fonction cérébrale

Dans le système nerveux central, le lien entre la structure et la fonction est fort mais il n'est pas total. En effet, s'il existe une corrélation forte entre la fonction d'une aire corticale et sa structure, cette dernière conditionne mais ne détermine pas totalement la fonction des réseaux de neurones¹⁰. Par exemple, la connectivité fonctionnelle (en connectomique, la connectivité cérébrale fonctionnelle est définie par les liens fonctionnels

entre différentes régions du cerveau) ne peut pas être expliquée que sur la base de l'anatomie. Il est intéressant de noter que la relation entre structure et fonction se base sur des échelles de temps fondamentalement différentes : si la structure est quasi-stationnaire (la structure du cerveau ne change pas ou peu sur l'échelle de temps d'une session d'imagerie, par exemple), la fonction est par nature un outil d'étude dynamique, sur des échelles de temps courtes. Le lien structure-fonction est un domaine actif de recherche, et dans notre cas, de par le développement technologique de la technique des ultrasons fonctionnels permettant l'étude de la fonction par la structure, nous utiliserons ce lien structure-fonction afin de permettre les études de ce manuscrit.

1.2.2. Mise en place du système nerveux chez les embryons de mammifères

Après la fécondation de l'ovule par le spermatozoïde, l'embryon passe rapidement à un stade pluricellulaire où les premières différenciations cellulaires ont lieu au moment de la gastrulation, l'œuf s'organisant en trois feuillets distincts : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme.

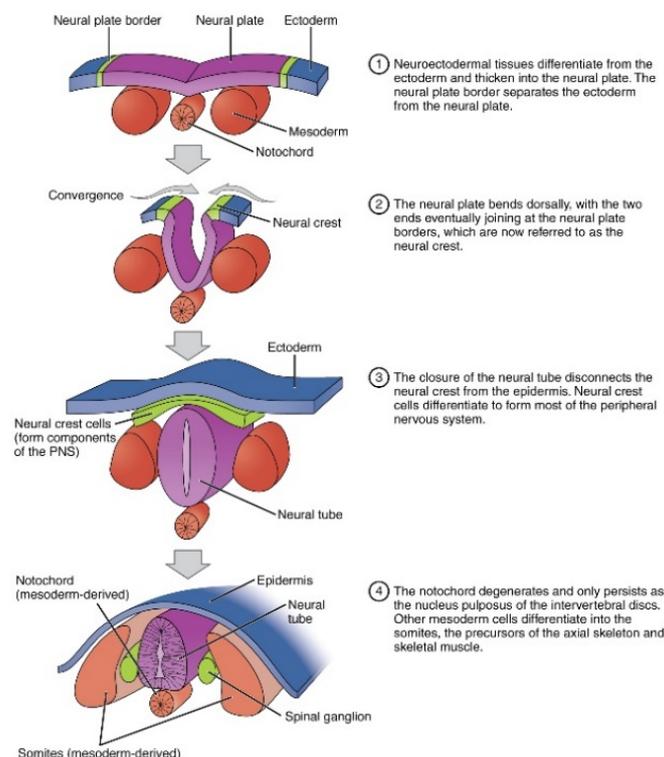


Figure 6. Neurulation de l'embryon et mise en place du système nerveux central. La notocorde permet la formation de la plaque neurale, qui s'invagine alors pour donner le tube neural (précurseur du système nerveux central) avant que la crête neurale ne forme les prémises du système nerveux périphérique.

Une partie du mésoderme forme la notocorde (qui deviendra la colonne vertébrale) et induit l'étape de neurulation durant laquelle, par le biais de signalements biochimiques (notamment Sonic Hedgehog (SHH) responsable de l'organisation dorso-ventrale de l'embryon et les Transforming Growth Factor β (TGF β)), elle provoque la formation de la plaque neurale et de la crête neurale au niveau de l'ectoderme. La plaque neurale s'invagine pour donner le tube neural et les deux côtés de la crête neurale se rejoignent et fusionnent puis se détachent de l'ectoderme. L'entièreté du système nerveux central est dérivée du tube neural tandis que le système nerveux périphérique est dérivé de la crête neurale¹¹

Le tube neural poursuit son développement par la différenciation primaire de 3 vésicules dans la partie caudale du tube : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Le reste du tube neural forme la moelle épinière¹¹.

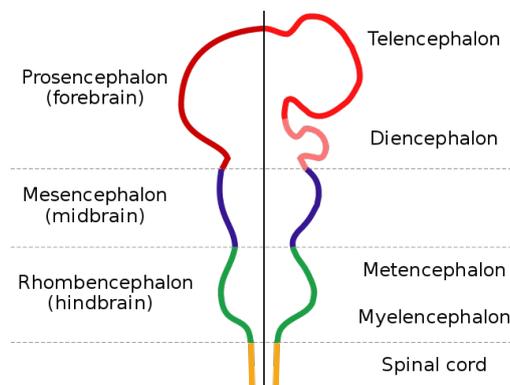


Figure 7. Différenciation du tube neural. À gauche, nous observons les premiers stades de la différenciation, avec l'apparition du prosencéphale, du mésencéphale, du rhombencéphale et de la moelle épinière. Au fur et à mesure du développement, ces structures se divisent en sous-structures dont les noms sont donnés à droite du schéma.

Le prosencéphale se divise alors en télencéphale et en diencephale, où, chez l'homme, vers la 4^{ème} semaine de gestation, a lieu un bourgeonnement du diencephale vers une partie de l'ectoderme. L'invagination de cette partie de l'ectoderme entre la 5^{ème} et 6^{ème} semaine de gestation forme alors l'œil (cornée, cristallin et vésicule optique). La rétine commence à se différencier à partir de l'excroissance du diencephale vers le 3^{ème} mois de gestation pour finir ses connexions nerveuses avec le cerveau jusqu'à après la naissance.

Nous avons alors en place, et dérivé du tube neural originel, la moelle épinière, le cerveau et la rétine, qui appartiennent donc tous les trois au même ensemble qu'est le système nerveux central.

Le système nerveux périphérique se met, lui, en place à partir de la crête neurale qui va se différencier pour donner les ganglions de la racine dorsale qui projettent leurs terminaisons nerveuses dans le reste du corps.

L'étude des premiers stades du développement du système nerveux permet d'en comprendre l'architecture globale. Cependant, au sein même des mammifères, il existe de très nombreuses disparités nées de divergences évolutives. Nous allons désormais nous attacher à une rapide étude comparée des cerveaux du rat de laboratoire *rattus norvegicus* avec celle des macaques *macaca mullata* et d'*homo sapiens*.

1.2.3. Anatomie comparée du cerveau : des rongeurs aux primates

Depuis les balbutiements des neurosciences jusqu'à aujourd'hui, celles-ci ont pour but l'exploration et une meilleure compréhension du cerveau. Si des expériences, non invasives, peuvent être conduites sur des humains, pour la plupart sur des sujets volontaires sains, dans une IRM ou pour des EEGs, ou s'agissant pour d'autres d'expérimentations per-opératoires dans un bloc chirurgical, la majeure partie des expériences ne peuvent pas être réalisées sur l'être humain, pour des raisons d'éthique évidentes. Pour remplacer ces expérimentations, il est possible de mener des expériences *ex vivo* ou *in silico*, mais les expérimentations animales s'avèrent nécessaires dans la constitution de nombreuses études, notamment celles impliquant des manipulations génétiques (optogénétiques ou sonogénétiques par exemple), ou celles visant l'étude du comportement d'une partie du cerveau dans une tâche particulière.

Pour ne pas perdre de vue l'objectif énoncé précédemment, à savoir la connaissance la plus fine et exacte possible du cerveau humain, il devient à ce titre intéressant d'effectuer une étude d'anatomie comparée entre la ou les espèces animales utilisées dans une étude et l'être humain, pour pouvoir potentiellement généraliser les résultats obtenus à l'échelle de l'humain lui-même. Ainsi, dans ce paragraphe, nous aborderons rapidement quelques points d'anatomie comparée entre les espèces *rattus norvegicus*, *macaca mulatta* et *homo sapiens* afin de mieux comprendre et de souligner les similarités tant structurelles que fonctionnelles entre ces espèces et l'utilité de l'étude des deux premières dans la compréhension plus fine de la dernière.

Chez *homo sapiens*, le cerveau occupe un volume moyen de 1300 cm³, pour un poids moyen de 1300g. Il s'agit du cerveau le plus volumineux du groupe des hominoïdes actuels et à plus forte raison des primates (à titre de comparaison, le chimpanzé *pan paniscus* possède un cerveau d'environ 400g)

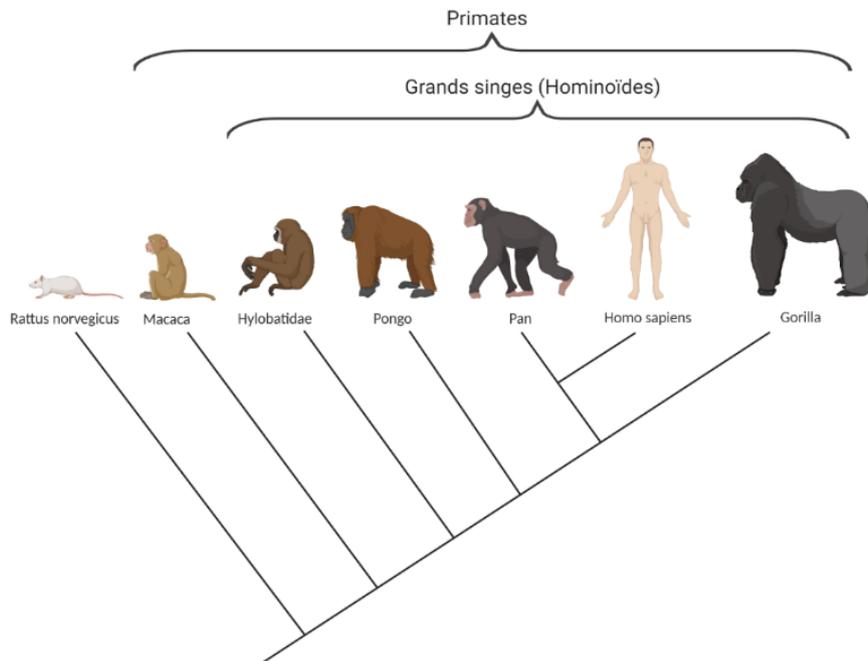


Figure 8. Arbre phylogénétique simplifié des grands singes, du macaque rhesus et du rat de laboratoire. Toutes les espèces appartiennent à la classe des mammifères. Le macaque et les grands singes à l'ordre des primates. Les grands singes, y compris l'humain, à la famille des hominoïdes.

Chez les 2 modèles animaux utilisés au cours de cette thèse, *rattus norvegicus* possède un cerveau beaucoup plus modeste d'environ 2g, alors que *macaca mulatta* possède un cerveau pesant en moyenne 95g. Mais au-delà des considérations purement volumiques, l'architecture cérébrale change beaucoup entre ces 3 espèces.

Si l'humain et le macaque rhesus possèdent un cerveau plissé, ce n'est pas le cas du rat, qui possède une surface corticale entièrement lisse. L'apparition de circonvolutions, ou *gyri*, chez les mammifères de taille supérieure permet une augmentation notable de la surface occupée par le cortex avec une augmentation contenue du volume de cerveau. Ainsi, chez le macaque rhesus, le cortex occupe une surface d'environ $5 \cdot 10^4$ mm² et environ $3 \cdot 10^5$ mm² (0,3m²) chez l'être humain alors que chez le rat, la surface occupée par le cortex est d'environ $6 \cdot 10^2$ mm².

En ce qui concerne la taille du cervelet, celle-ci est d'un ratio constant chez les espèces de mammifères et compte pour environ 10% du volume de cerveau, que ce soit chez le rat, le macaque ou l'être humain¹².

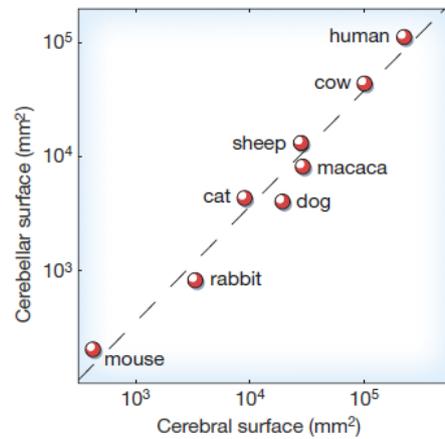


Figure 9. Ratio entre la surface corticale et la surface du cervelet, quasi constante entre les espèces et de l'ordre de 10%.

Outre l'apparition de *sulci* et *gyri* chez le macaque et l'être humain par rapport au rat, nous observons aussi un changement au niveau de la taille des aires cérébrales. Si le bulbe olfactif est très développé chez le rat, et compte pour environ 2% du volume total du cerveau (contre 0,01% pour l'être humain¹³), il ne possède pas de cortex préfrontal à proprement parler (même s'il existe des analogies anatomiques pouvant ressembler à un cortex préfrontal¹⁴) alors qu'il occupe environ 10% de la surface totale du cerveau chez le macaque rhésus et 30% de la surface du cerveau de l'être humain.

Ces différences anatomiques entre les espèces influent beaucoup sur les capacités cognitives desdites espèces. Si l'humain et le macaque sont capables de tâches complexes comme la réalisation de mouvements oculomoteurs régis par un ensemble de règles, ce n'est pas le cas du rat où l'empan des règles pouvant être apprises par conditionnement opérant est plus faible. Si l'être humain est capable de métacognition (connaissance personnelle d'un individu sur ses capacités et fonctionnement cognitif, *Larousse*) et de généralisation des règles, ce n'est pas le cas du macaque qui se trouve incapable de généraliser des règles déjà apprises à des situations légèrement différentes, du moins dans le cadre des règles apprises pour l'expérimentation de laboratoire

Pour l'étude de mécanismes neuronaux de bas niveau, le rat de laboratoire se trouve être un excellent modèle, de par sa taille ou sa disponibilité en tant qu'espèce de recherche. Dans ce manuscrit, le rat de laboratoire a été utilisé pour l'étude de la nociception au niveau de la moelle épinière, qui se trouve être, si on réalise une anatomie comparée de la moelle d'un rat avec celle d'un être humain, très similaire au niveau des structures et des fonctions. Par contre, à cause d'une architecture cérébrale assez différente de celle de l'être humain, il n'est pas un bon modèle pour l'étude de la cognition. Pour l'étude de cette dernière, nous avons utilisé le modèle du macaque rhésus, qui se trouve avoir un cerveau beaucoup plus similaire au cerveau d'un être humain, avec notamment la présence de *sulci* et de *gyri* et une organisation fonctionnelle proche, ce qui en fait un bien meilleur modèle pour l'étude de processus cognitif complexe, à l'inverse du rat de laboratoire.

1.2.4. Glie et neurones : étude de la composition d'un cerveau

Au-delà des considérations macroscopiques sur l'architecture d'un cerveau, il est important de se pencher sur la composition cellulaire de ce dernier, afin de mieux appréhender ce qui constitue l'origine des signaux que l'on va mesurer avec les techniques d'imagerie cérébrale. L'imagerie fonctionnelle ultrasonore mesure un signal relié au nombre de diffuseurs ultrasonores en mouvement, et non l'activité directe des neurones (mesurée par exemple par électrophysiologie, comme nous le verrons un peu plus tard). Pour comprendre ce qu'est le couplage neurovasculaire, élément clé de la mesure de l'activité par les ultrasons, nous avons besoin de comprendre ce qui compose le cerveau et la chaîne des événements qui vont conduire au couplage neurovasculaire.

Au sein de la matière composant le cerveau, les cellules peuvent être classées en deux grandes populations. La première population, les neurones, comprend les cellules capables de transmettre un influx électrique à grande vitesse sous la forme de potentiel d'action.

L'autre population, la glie, comprend tout le reste des cellules entrant dans la composition du cerveau. Si nous ne nous intéressons pas directement à la glie dans ce travail de recherche, elle reste un chaînon fondamental de l'activité métabolique du cerveau et rentre très probablement dans la chaîne menant au couplage neurovasculaire.

Ainsi, nous nous attacherons à décrire de façon succincte la composition de la glie et son rôle au sein du cerveau.

Quatre grandes familles de cellules composent la glie dans le système nerveux central : les astrocytes, les oligodendrocytes, les épendymocytes et la microglie.^b

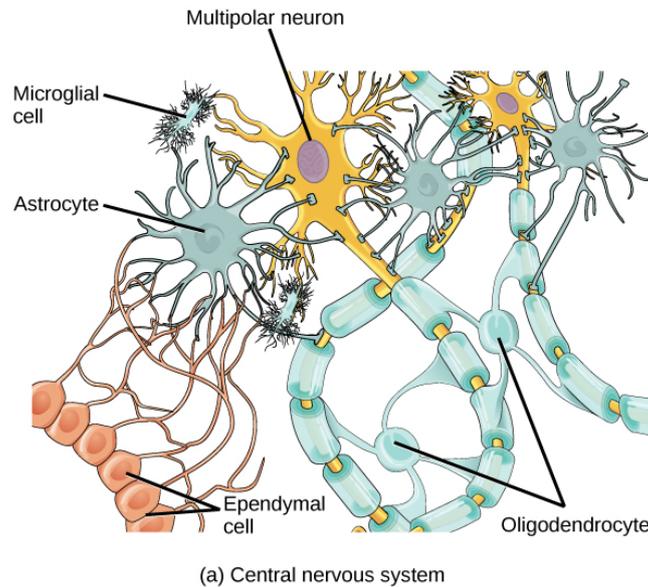


Figure 10. Composition de la glie du système nerveux central. D'une part, la microglie, jouant le rôle de système immunitaire du SNC et d'autre part, la macroglie, composée des astrocytes, support métabolique des neurones, des oligodendrocytes, formant la gaine de myéline, et des épendymocytes qui génèrent le liquide céphalospinal.

La microglie est considérée le système immunitaire du système nerveux central. Composée de cellules capables de phagocytose et de sécrétions de cytokines, elle a pour rôles deux fonctions primaires que sont la défense du SNC face à des pathogènes étrangers ou le maintien de l'homéostasie en permettant la phagocytose des débris cellulaires et des déchets présents dans le SNC¹⁵. De récentes découvertes dans le domaine de la microglie soutiendraient qu'il existe un rôle de « frein » au sein de synapse comprenant de la microglie. Celle-ci sert alors d'inhibiteur pour permettre au cerveau d'intégrer l'information¹⁶ et elle pourrait donc jouer un rôle dans la cascade des événements menant au couplage neurovasculaire.

Une autre catégorie de cellules composant la glie, et plus spécifiquement la macroglie (par opposition à la microglie ci-dessus), sont les cellules épendymaires. Les

^b <https://cnx.org/contents/c9j4p0aj@3/Neurons-and-Glial-Cells>

épendymocytes délimitent le canal de l'épendyme dans la moelle épinière ainsi que les ventricules dans le cerveau, et jouent à la fois le rôle de producteur du liquide cébrospinal et le rôle de barrière entre le liquide cébrospinal et le SNC. Les épendymocytes sont des cellules ciliées, et le but de ces cils est de mettre en mouvement le liquide cébrospinal dans le circuit ventricule-canal épendymaire au niveau du canal du mesencéphale.

Seconde classe de cellules de la macroglie, les oligodendrocytes ont pour rôle principal de former la gaine de myéline entourant les axones des neurones. De récentes recherches formulent aussi l'hypothèse que les oligodendrocytes jouent un rôle de support métabolique pour les neurones¹⁷, notamment avec le transport de lactate dans les axones à travers les monocarboxylate transporters 1 (MCT1) et jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie neuronale.

Dernière classe de cellules de la macroglie, les astrocytes sont les cellules gliales les plus présentes dans le cerveau. Les astrocytes sont des cellules fortement versatiles, jouant des rôles variés dans le fonctionnement du cerveau. Premièrement, ce sont des cellules permettant un maintien structurel du cerveau, grâce à leur forte ramification étoilée qui permet la formation d'un réseau structurel.

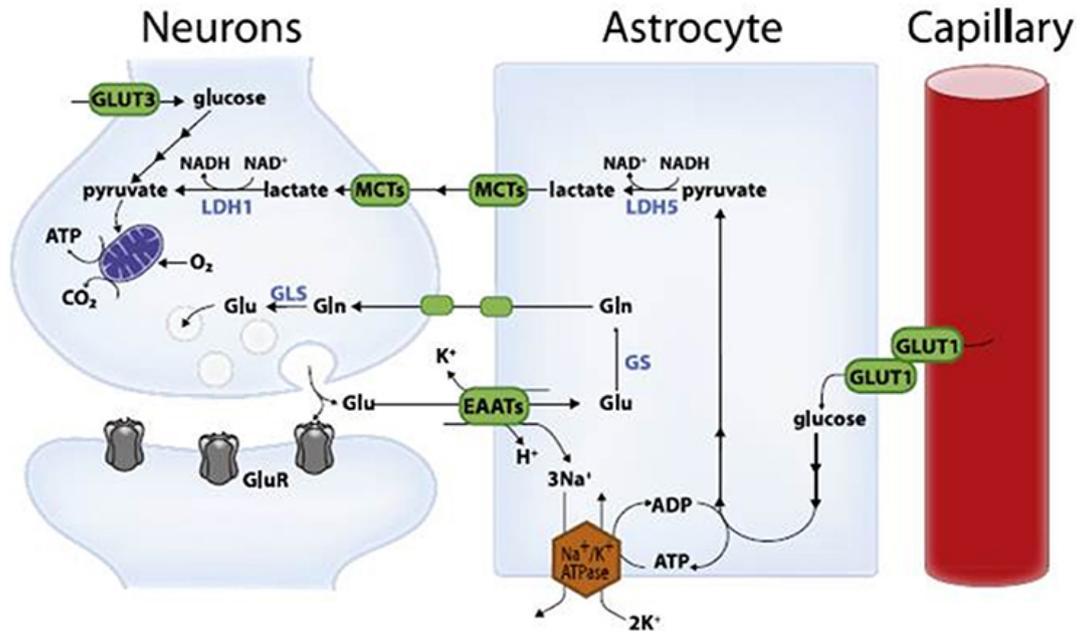


Figure 11. Navette Lactate astrocyte-Neurone montrant le rôle de support métabolique des astrocytes au neurones par le rôle de pré-métabolisation du glucose (extrait des vaisseaux sanguins par le transporteur GLUT1) en lactate et de la recapture du Glutamate (transporteur EAAT) et de son retransfert dans les neurones.

Au-delà du rôle de structuration du cerveau, les astrocytes jouent un important rôle de soutien métabolique aux neurones. En effet, les astrocytes sont liées aux capillaires sanguins dans le cortex, permettent l'entrée du glucose dans le cerveau puis assurent la transformation métabolique du glucose en lactate pour sa consommation par les neurones à travers la navette lactate astrocyte-neurone (Astrocyte Neuron Lactate Shuttle – ANLS)¹⁸

Possédant des réserves faibles de glycogène (en comparaison au foie), les astrocytes sont capables, en cas d'hypoglycémie systémique, de glycogénolyse afin de fournir de l'énergie aux neurones pour le maintien de l'homéostasie neuronale¹⁹ à travers le même cycle de glucose – pyruvate – lactate.

Les astrocytes ne servent pas que de support métabolique aux neurones, ils jouent aussi un rôle dans la modulation de l'activité neuronale. Celle-ci, comme nous le verrons dans la prochaine partie, est fortement liée à l'activité chimique dans les neurones, et à la concentration en neurotransmetteur dans l'espace synaptique. Le neurotransmetteur le plus courant dans le cerveau est le glutamate, ayant la propriété de se lier à un grand nombre de récepteurs (NMDA, AMPA, KAR ...), mais possédant une forte excitotoxicité si la concentration dans l'espace intersynaptique devient trop grande. Les astrocytes, dans le cadre des synapses tripartites²⁰, jouent aussi un rôle dans la recapture du glutamate (à travers la protéine de surface EAAT) et permet son retour dans le neurone excitateur pour sa réutilisation à travers le cycle glutamate – glutamine.

Si la glie est un composant très important du cerveau, l'activité neuronale est majoritairement régie par les neurones, qui sont la seconde grande classe de cellules présentes dans le cerveau. Dans le paragraphe suivant, nous nous attacherons à décrire les différentes classes de neurones corticaux (sans nous intéresser au cervelet) ainsi que leur mode de fonctionnement, autant dans la propagation électrique de l'influx neuronal que dans le fonctionnement synaptique.

1.2.5. Le neurone : activité neuronale électrique et chimique

Dans le cerveau, les neurones composent une classe de cellules répondant à un influx électrique ou chimique et responsable du traitement de l'information. Il s'agit, avec la glie, des cellules principales du système nerveux central.

Les neurones peuvent être classés en fonction de leur morphologie et de leur rôle en quelques grandes familles suivantes :

- Neurones unipolaires : neurones majoritaires des invertébrés²¹, les neurones unipolaires ne possèdent qu'un seul processus. Ce type de neurone est pratiquement absent des vertébrés.
- Neurones pseudo-unipolaires : neurones du système nerveux périphériques, les neurones pseudo-unipolaires sont les neurones sensoriels. Ils possèdent une longue dendrite avec les récepteurs sensoriels (mécanorécepteurs, chémorécepteurs, thermorécepteurs...) et projettent leur axone dans la moelle épinière.
- Neurones bipolaires : Comme les neurones pseudo-unipolaires, la majorité des neurones bipolaires (un axone et une dendrite) sont des neurones sensoriels qui projettent leur axone dans le système nerveux central
- Neurones multipolaires : les neurones multipolaires sont les neurones majoritaires dans le système nerveux central. Ils possèdent un axone et de multiples dendrites et peuvent avoir des fonctions diverses incluant les motoneurones, les neurones excitateurs ou inhibiteurs.

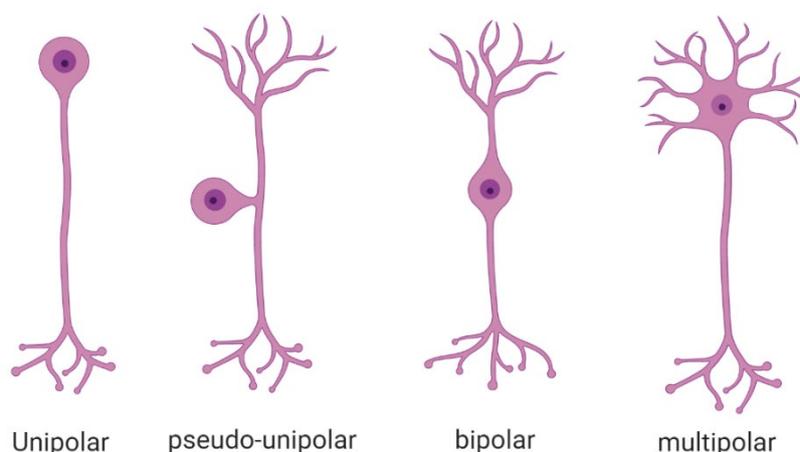


Figure 12. Schéma des différentes familles de neurones. L'unipolaire ne possède qu'un axone, le pseudo-unipolaire un axone et une dendrite, le bipolaire un axone et une dendrite avec le soma les séparant et le multipolaire un seul axone mais de multiples dendrites reliés au soma.

Dans le cortex, la très grande majorité des neurones sont des neurones multipolaires. Ceux-ci peuvent encore être classés en différentes sous classes, mais ici nous ne ferons que la distinction entre les neurones excitateurs (dont un représentant est le neurone pyramidal) et les neurones inhibiteurs (ou interneurons).

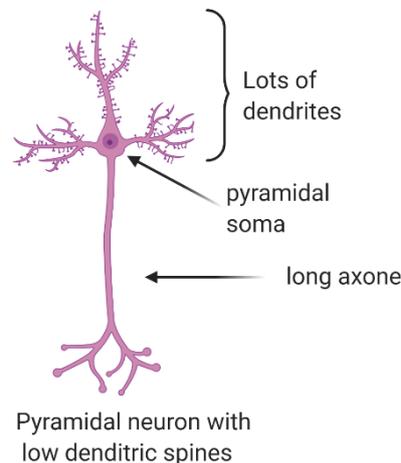


Figure 13. Neurone pyramidal : schéma. Nommé d'après la forme de leur soma, les neurones pyramidaux possèdent un long axone pouvant former de nombreuses synapses et un grand nombre de dendrites : ce sont des neurones multipolaires.

Les neurones pyramidaux doivent leur nom à la forme pyramidale de leur soma. Ce sont les principales cellules excitatrices du cortex dont le neurotransmetteur est le glutamate, et comptent pour environ deux-tiers des neurones corticaux.

La richesse de leur arbre dendritique dépend de leur positionnement au sein du cerveau. Les neurones pyramidaux des couches II/III des aires visuelles primaires semblent avoir un arbre dendritique moins riche que les neurones pyramidaux situés dans des aires visuelles supérieures²². En ce qui concerne l'unique axone des neurones pyramidaux, celui-ci se sépare en de nombreuses sous-unités axonales formant chacune une synapse, permettant à un neurone pyramidal d'exciter en même temps un grand nombre de cellules.

A l'inverse des neurones excitateurs, les neurones inhibiteurs composent environ 20% des neurones corticaux et utilisent l'acide γ -aminobutyrique ou GABA comme neurotransmetteur²³. En simplifiant, la balance entre excitation et inhibition est un facteur déterminant de l'activité neuronale globale, un interneurone inhibant de nombreux neurones excitateurs et étant lui-même excité par de nombreux neurones pyramidaux²⁴. L'inhibition locale est proportionnelle à l'excitation locale, renforçant l'idée

d'un schéma en boucle de rétroaction ou les neurones excitateurs excitent les inhibiteurs qui inhibent les excitateurs, etc.

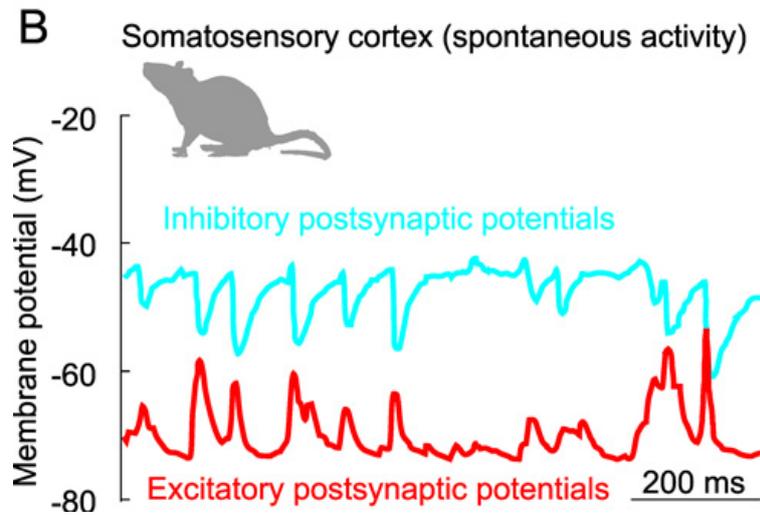


Figure 14. D'après Isaacson *et al.*, 2011²⁴. Dans le cortex somato-sensoriel du rat, les potentiels inhibiteurs (IPSP, bleu) sont inversement corrélés aux potentiels excitateurs (EPSP, rouge), renforçant l'idée de boucles de rétroactions dans le système excitateurs-inhibiteurs.

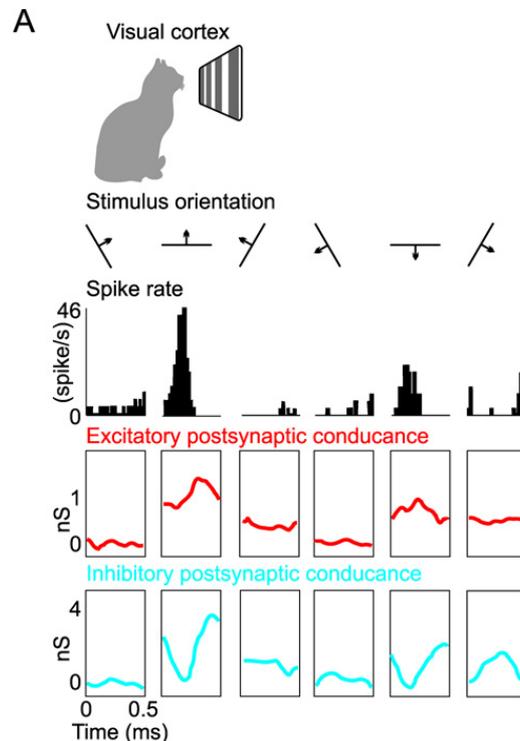


Figure 15. D'après Isaacson *et al.*, 2011. Dans le cortex visuel du chat, la balance entre potentiels excitateurs (rouge) et potentiels inhibiteurs (bleu) permet de discriminer finement la différence d'orientation et de mouvement de barres verticales se déplaçant sur un écran, confortant l'hypothèse que la balance EPSP/IPSP permet d'affiner la discrimination de l'activité neuronale.

Ces boucles de rétroactions entre les neurones excitateurs et inhibiteurs sont des chefs d'orchestres de l'activité neuronale et permettent d'affiner l'activité neuronale. Par exemple, dans le système visuel, la balance d'inhibition/excitation permet de discriminer différents stimuli en ayant une balance excitation/inhibition plus ou moins importante.

S'il est important de classifier les neurones pour comprendre plus finement nos observations, il est aussi important de comprendre le mécanisme de conduction électrique que nous sommes capables d'observer en utilisant l'électrophysiologie. Le premier modèle physique et mathématique de la propagation de l'influx électrique a été proposé en 1952 par Hodgkin et Huxley²⁵. Ceci montre que l'influx électrique qui se propage le long des axones est composé d'un courant dû aux ions sodium Na^+ , potassium K^+ en majorité ainsi que l'existence d'un courant de fuite majoritairement dû aux ions chlorure Cl^- .^c

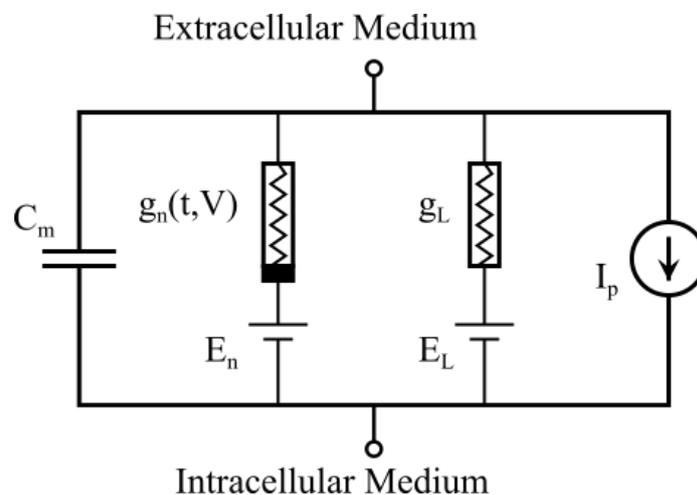


Figure 16. Schéma électrique du modèle de Hodgkin et Huxley pour la propagation le long d'un axone.

Sur un axone, l'influx électrique se propage linéairement depuis le soma vers les bourgeons synaptiques. La vitesse de l'influx est dépendante de la gaine de myéline formée par les oligodendrocytes sur les axones (dans le système nerveux périphérique, ce sont les cellules de Schwann qui forment la gaine de myéline des axones des neurones pseudo-unipolaires) en permettant à l'influx électrique de progresser par conduction saltatoire de nœud de Ranvier en nœud de Ranvier.

^c By Krishnavedala - Own work, CC0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=21725464>

Au niveau de chaque nœud de Ranvier, le champ électrique local permet l'ouverture des canaux ioniques (Na^+ et K^+) permettant l'inversion de la polarité locale du champ électrique et donc la propagation du potentiel d'action avec une vitesse bien supérieure à la vitesse de l'influx sur une gaine axonale non myélinisée ($\sim 150\text{m/s}$ avec une gaine de myéline vs. $0,5$ à 10m/s sans gaine de myéline.)

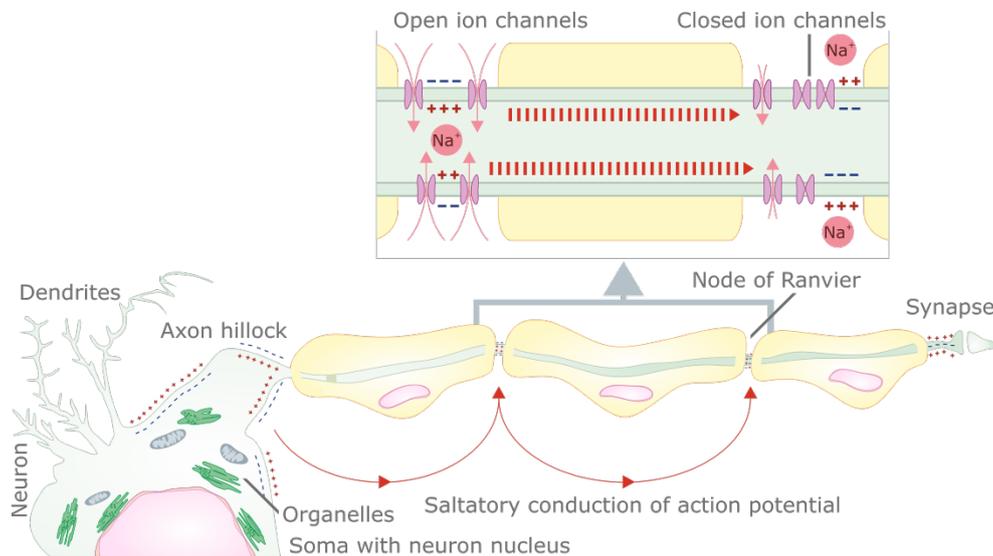


Figure 17. Conduction saltatoire de nœud en Ranvier en nœud de Ranvier le long d'un axone. L'information « saute » de nœud en nœud et le champ électrique local permet l'ouverture des canaux ioniques du nœud suivant, permettant l'inversion de polarité nécessaire à la conduction du potentiel d'action.

Si nous sommes capables de mesurer directement l'activité électrique du cerveau par différentes techniques (électrophysiologie, électrocorticographie, électroencéphalographie, magnétoencéphalographie, etc.), d'autres techniques d'imagerie s'appuient sur le besoin métabolique des neurones et l'augmentation locale du flux sanguin qui en découle. Dans le prochain paragraphe, nous nous attacherons à l'étude du couplage entre l'activité neuronale et l'activité vasculaire : le couplage neurovasculaire.

1.2.6. Activité vasculaire induite : couplage neurovasculaire

L'activité cérébrale est fortement consommatrice d'énergie. Nous avons vu dans le paragraphe 1.2.4 que la glie est responsable, entre autre, du support métabolique aux neurones, et que celle-ci ne possède pas ou peu de réserve, nécessitant un apport constant en métabolites pour le fonctionnement normal des neurones²⁶. A la fin des années 1800, Angelo Mosso, médecin italien, est le premier à étudier le couplage neurovasculaire à travers son sphygmomanomètre en mesurant des pics de tension artérielle chez certains patients présentant des défauts osseux dans le crâne²⁷, plus particulièrement en mesurant des différences de pulsatilité et de volume sanguin au niveau du cerveau (avec une référence placée au niveau du bras) lorsque le sujet est impliqué dans une tâche cognitive.

Par la suite, des techniques plus contemporaines de mesure de l'activité cérébrale ont vu le jour, comme nous le verrons dans une partie future (1.3) comme l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf ou fMRI en anglais), l'imagerie infrarouge de surface (fNIRS pour fonctional Near InfraRed Spectroscopy) ou encore l'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS pour fonctional UltraSound), et certaines ont été mises en relation directe avec l'activité neuronale mesurée par électrophysiologie^{28,29}

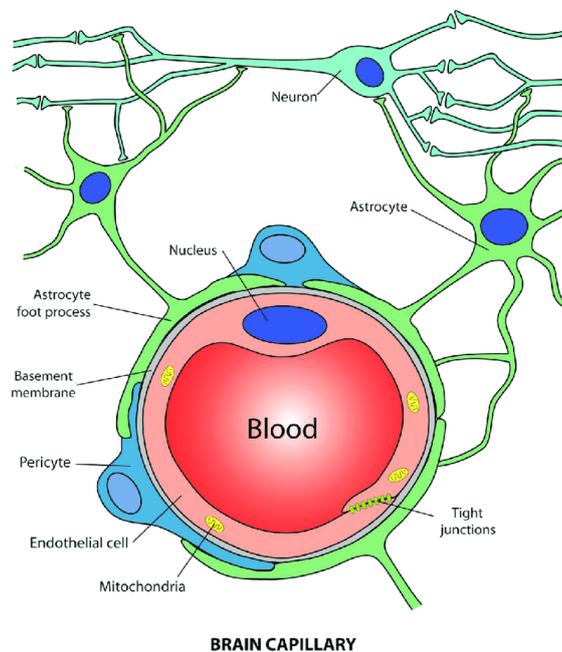


Figure 18. Schéma d'une unité neurovasculaire. Une UNV est composée des cellules endothéliales formant la paroi des vaisseaux sanguins, des astrocytes et de leurs pieds en contact avec les cellules endothéliales et la lamina basale et des péricytes

L'étude du couplage neurovasculaire commence avec celle de l'unité neurovasculaire (UNV ou NVU en anglais). L'UNV est une unité anatomique et fonctionnelle composée des cellules endothéliales formant les parois des vaisseaux sanguins, d'une couche composée de cellules musculaires lisses et de péricytes. Elle comprend aussi les cellules gliales, comme les astrocytes, et des cellules neuronales dont les messagers chimiques vasodilatateurs ou vasoconstricteurs vont rentrer dans le mécanisme du couplage neurovasculaire^{30,31}. L'UNV permet le maintien de l'homéostasie cérébrale, tant par le maintien d'une perfusion basale apportant constamment un flux de nutriments aux neurones que par la possibilité d'une hyperémie dans les cas où les neurones auraient un besoin accru en oxygène et nutriments tel le glucose (pré-métabolisé par les astrocytes en pyruvate, voir 1.2.4).

Dans le cerveau, le couplage neurovasculaire s'effectue en premier lieu au niveau des capillaires sanguins du cortex³¹ avant de se propager aux plus gros vaisseaux. Au niveau des capillaires, les messagers chimiques responsables de la vasodilatation peuvent être, par exemple, l'oxyde d'azote NO, le glutamate, les prostaglandines, l'adénosine triphosphate (ATP). Ces messagers sont majoritairement produits et relâchés par les astrocytes, notamment au niveau du pied astrocytaire en contact serré avec les cellules endothéliales. Quant aux péricytes, si leur rôle est moins connu, il semblerait qu'ils soient responsables d'un couplage neurovasculaire à plus grand échelle (le long de plusieurs UNVs)^{31,d}.

Le couplage neurovasculaire est une activité physiologique complexe dont l'étude des mécanismes microscopiques est un sujet très actif de recherche. Dans le cadre de la présente thèse, nous ne nous intéresserons pas aux mécanismes microscopiques du couplage neurovasculaire, mais uniquement à ses conséquences, plus particulièrement à l'hyperémie fonctionnelle induite par une augmentation de l'activité neuronale. Il existe plusieurs façons de mesurer l'activité cérébrale, que ce soit l'activité électrique ou sa résultante, et nous allons nous attacher, dans la partie suivante, à décrire les techniques d'imagerie cérébrale et d'exploration de l'activité du cerveau.

^d D'après Adkins et al., 2013 : Crossing the barrier : The role of the blood-brain barrier in treating mental illness³²

1.3. Techniques d'exploration de l'activité cérébrale : historique et descriptif.

Afin de pouvoir explorer l'activité cérébrale, plusieurs techniques ont été mises au point, autant pour explorer l'activité électrique, par exemple par électrophysiologie ou électroencéphalographie (EEG) que l'activité magnétique induite par magnétoencéphalographie (MEG) ou encore des marqueurs indirects de l'activité neuronales comme l'activité métabolique par imagerie nucléaire par tomographie à émission de positon (PET-scan pour Positon Emission Tomography) ou encore, comme discuté dans le paragraphe précédent, l'hyperémie fonctionnelle par IRMf, fUS, NIRS, etc.

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons en détail aux techniques utilisées dans ce manuscrit et décrirons les autres plus succinctement, afin d'avoir un aperçu global des techniques actuelles d'imagerie cérébrale.

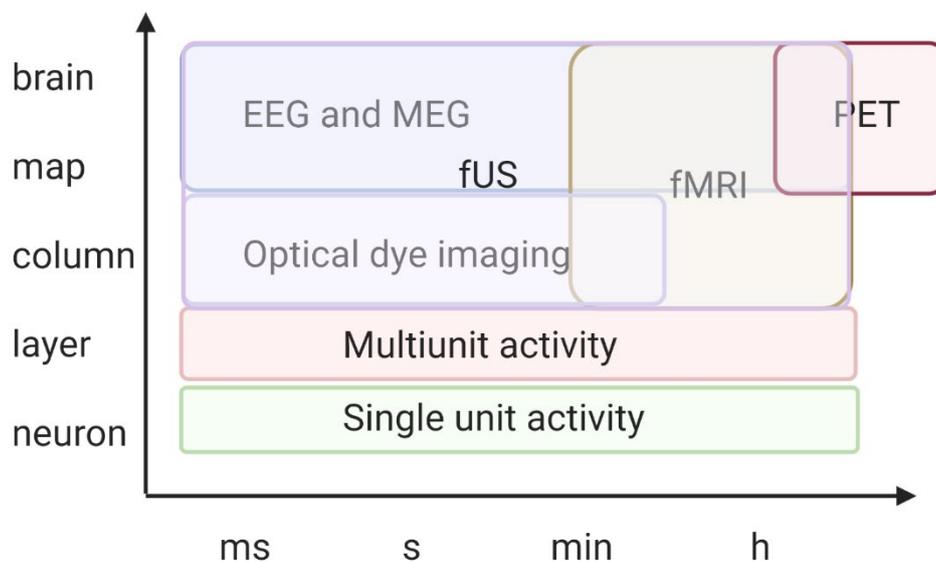


Figure 19. Diagramme de résolution spatiale et temporelle des différentes techniques d'imagerie cérébrale. Le fUS recouvre la résolution de l'EEG, MEG, Optical dye et fMRI

1.3.1. Electrophysiologie

L'électrophysiologie mesure les courants électriques induits par les déplacements ioniques lors de la dépolarisation des neurones au passage d'un potentiel d'action et possède une excellente résolution temporelle de l'ordre de 10^5 Hz. La mesure est effectuée à l'aide d'une ou plusieurs électrodes, généralement métalliques, introduites dans le cerveau de façon aiguë ou chronique. Les variations de potentiels mesurés par une microélectrode sont très faibles, de l'ordre du mV, c'est pour cela que les montages d'électrophysiologie ont besoin d'un étage de préamplification avant de mesurer le signal. Cependant, ces montages sont extrêmement sensibles au bruit et requièrent de nombreuses méthodes pour limiter ce dernier, comme des cages de Faraday autour de l'animal et des méthodes de filtrage du signal pour limiter le bruit parasite.

S'il est difficile de réaliser des enregistrements intracellulaires dans un cerveau entier³³, cette technique étant préférentiellement réservées à des cellules isolées (comme pour les enregistrements de l'axone de calamar géant par Hodgkin et Huxley, appelé Patch Clamp), il est assez aisé de réaliser des enregistrements extracellulaires d'un (single unit activity, ou SUA) ou plusieurs (multi-unit activity, ou MUA) neurones. La présence d'une électrode dans le cerveau permet aussi d'enregistrer les potentiels de champs locaux (ou Local Field Potential, LFP) donnant accès à l'activité moyenne des neurones dans une large zone (soit une sphère d'environ 600 μ m de diamètre autour de l'électrode). Cette dernière mesure se rapproche d'une mesure effectuée en routine chez l'Homme, chez qui l'implantation d'électrode à des fins de mesure n'est pas envisageable : l'électroencéphalographie.

1.3.2. Electro-encéphalographie (EEG) et électro-corticographie (ECoG)

Similaire sur le principe de la nature de l'enregistrement à l'électrophysiologie, l'EEG ou l'ECoG ne sont pas aussi invasives. En effet, il s'agit de mesurer les courants de surface produits par le cerveau à l'aide d'électrodes positionnées soit sur le scalp pour l'EEG (e.g. Figure 20) soit sur la surface du cortex pour l'ECoG. Cependant, si l'électrophysiologie permet de mesurer l'activité en SUA ou MUA, l'EEG et l'ECoG sont spatialement beaucoup moins définies. Il s'agit d'une technique avec une très bonne

résolution temporelle (proche de 1000 Hz) mais ayant une très mauvaise résolution spatiale.

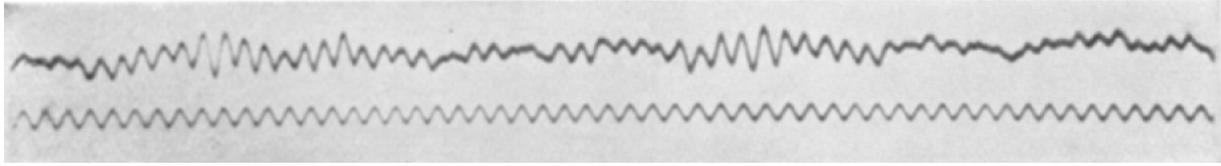


Figure 20. Premier EEG enregistré chez l'homme par Berger, publié en 1929

La résolution spatiale de l'EEG étant mauvaise, une approche purement temporelle y est préférée, avec une représentation sous la forme de graphe présentant des oscillations typiques de certains états du cerveau (appelées « ondes » ou « rythmes »). Cependant, depuis quelques années, de nouvelles approches par analyses en composantes indépendantes (ou ICA pour Independent Component Analysis) permettent d'ajouter une dimension spatiale à l'EEG en recherchant la « source » du signal recueilli sur toutes les électrodes et en retirant les différents artefacts auquel l'EEG est soumis comme les clignements, les micro-mouvements de la tête, etc.

Si l'EEG et l'ECOG mesurent directement l'activité électrique du cerveau, il est aussi possible de mesurer un effet de ce courant électrique : le champ magnétique induit. C'est le rôle de la MEG pour MagnetoEncephalographie dont le principe est similaire à l'EEG.

1.3.3. Magnétoencéphalographie (MEG)

Avec l'avènement des matériaux supraconducteurs est arrivée la possibilité de mesurer des champs magnétiques très faibles avec une précision remarquable. La magnétoencéphalographie, ou MEG, exploite un comportement des matériaux supraconducteurs séparés par un isolant, appelé *effet Josephson* ou magnétomètre SQUID pour Superconducting QUantum Interference Device afin de mesurer les très faibles champs magnétiques produits par le cerveau lors de son activité.

Cette technique, bien que parfaitement non invasive et plus précise que l'EEG, les champs magnétiques étant moins distordus que les champs électriques par le scalp, reste très chère et n'est pas utilisée en routine en clinique, contrairement à l'EEG.

Quelques utilisations marginales de la MEG commencent à voir le jour pour la recherche du foyer épileptique ou le diagnostic précoce de maladies neurodégénératives.

1.3.4. Near InfraRed Spectroscopy (NIRS)

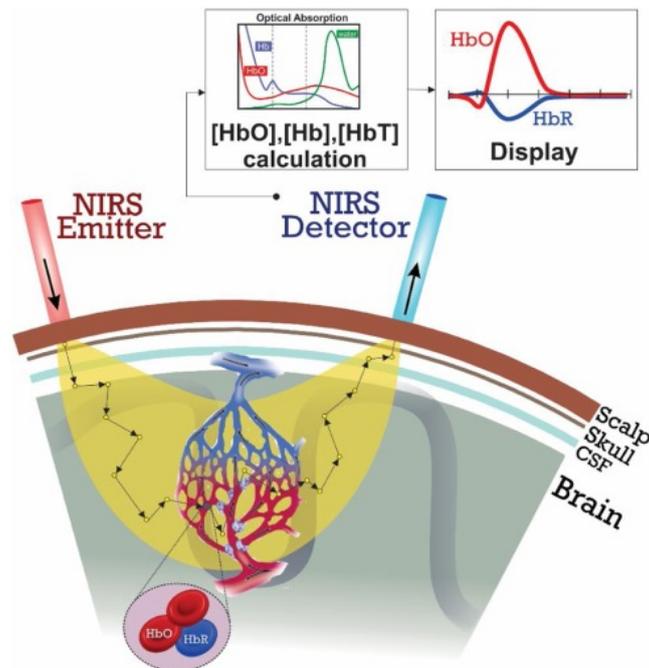


Figure 21. Schéma de fonctionnement de la fNIRS (Mohammadi-Nejad et al., 2018).

Un rayonnement infrarouge (situé dans la « fenêtre biologique ») est émis en un point et récupéré sur un détecteur. Le principe de la fNIRS repose sur la différence d'absorption de l'oxyhémoglobine et de la desoxyhémoglobine, ce qui permet de remonter aux activations fonctionnelles locales.

La spectroscopie infrarouge fonctionne sur l'absorption de la lumière par des chromophores. Dans le cadre de la spectroscopie fonctionnelle dans le proche infrarouge, les chromophores sont les globules rouges et plus particulièrement l'hémoglobine. En effet, si cette dernière oscille entre le statut d'oxyhémoglobine [HbO] et de desoxyhémoglobine [Hb] en fonction du transport ou non d'oxygène, elle va absorber différemment la lumière infrarouge, ce qui permet d'effectuer le rapport $[HbO]/[Hb]$ et donc de déterminer des activations fonctionnelles (consommatrice d'oxygène) ou non.

Si cette technique possède encore une excellente résolution temporelle, sa résolution spatiale, basée sur la diffusion multiple de la lumière, est très mauvaise. Elle présente cependant l'intérêt d'être totalement non invasive et portable, ce qui en fait une méthode de choix pour les interfaces cerveau machine basée sur la réponse hémodynamique.

1.3.5. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM ou MRI)

Jouant avec la physique quantique, l'IRM est l'une des techniques les plus connues du grand public pour l'imagerie du corps humain. Son principe est basé sur la résonance magnétique nucléaire, ou RMN, phénomène de couplage entre un champ magnétique externe, ici un aimant supraconducteur, et le moment magnétique des atomes, dans notre cas, d'hydrogène. En 1973, Paul Lauterbur réalise la première image en 2D se basant sur le principe de l'IRM. En 1975, Peter Mansfield réalise les premières images d'un tissu humain et c'est en 1977 qu'arrive la première image d'un corps humain vivant obtenu par IRM. P. Lauterbur et P. Mansfield recevront, en 2003, le prix Nobel de Médecine pour leurs travaux sur l'imagerie par résonance magnétique.

1.3.5.1. Principe physique de l'IRM

Au repos, les aimantations des noyaux d'hydrogène dans un corps humain se compensent statistiquement entre elle, résultant à une aimantation moyenne nulle dans un corps humain. Si nous considérons un IRM possédant un champ magnétique statique \vec{B}_0 d'une valeur typique de 1,5 Tesla dans le cadre d'un appareil commercial standard, les aimantations des noyaux d'hydrogène vont s'aligner selon ce champ magnétique, noté orienté par convention selon l'axe z , tel que $\vec{B}_0 = B_0 \vec{e}_z$. Une fois dans ce champ magnétique statique, est appliqué un champ magnétique transitoire \vec{B}_1 perpendiculaire au champ \vec{B}_0 à l'aide de bobines, orientant l'aimantation des atomes d'hydrogène selon un axe perpendiculaire à l'axe \vec{e}_z . Une fois le champ magnétique \vec{B}_1 éteint, les noyaux des atomes d'hydrogène vont se réaligner sur le champ magnétique \vec{B}_0 dans un mouvement de précession autour du champ magnétique \vec{B}_0 . Le temps que vont mettre les protons pour se réaligner dans ce champ magnétique est directement dépendant de la nature du milieu environnant. Si le milieu est à agitation thermique forte comme l'eau ou le liquide céphalospinal (LCS), le temps de relaxation est élevé (de l'ordre de 4 secondes pour l'eau et le LCS). Si le milieu est à agitation thermique faible, c'est-à-dire si les molécules sont fortement contraintes, le temps de relaxation est aussi élevé (de l'ordre de 0.9 sec pour les muscles). Pour les milieux intermédiaires, le temps de relaxation T_1 est faible (250ms pour la graisse), ce qui permet d'avoir des images dites

de contraste T_1 ou le gras apparaît en hypersignal (brillant) et les structures plus denses ou plus fluides en hyposignal.

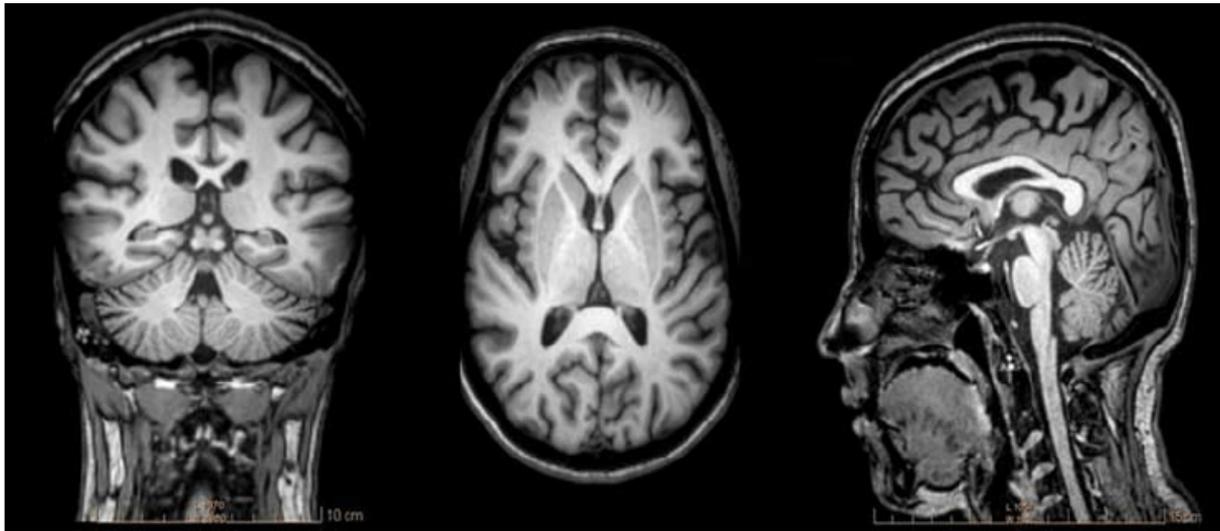


Figure 22. Imagerie IRM en contraste T_1 d'un cerveau humain (d'après Acer *et al.*, 2011). On voit, en hypersignal les structures molles (ici la matière grise et blanche et la peau) tandis que les structures plus denses comme l'os ou plus fluides comme le liquide céphalospinal apparaissent en hyposignal (en noir).

Si l'imagerie de contraste T_1 est la méthode de choix en imagerie IRM, il existe aussi d'autres séquences permettant d'imager le *temps de relaxation transversale* T_2 . En effet, l'environnement physico-chimique des protons est fortement variable, en fonction de l'appartenance du proton à une molécule libre comme H_2O , une molécule de gras, à un os, etc., ce qui va modifier très légèrement la fréquence de précession de Larmor. Si le temps T_1 mesure la ré-aimantation, le temps T_2 mesure la disparition de l'aimantation selon le plan transversal. En IRM T_2 , le gras devient hypointense et l'eau, le sang et le LCS deviennent hyperintense. L'imagerie par contraste T_2 permet de détecter les systèmes liquidiens.

En ce qui concerne la résolution spatiale et temporelle d'un IRM, pour un système clinique standard, sa résolution temporelle est de l'ordre de la seconde et sa résolution spatiale de l'ordre du millimètre. Pour des systèmes de recherche à haut champ, il existe des systèmes pour le petit animal pouvant aller jusqu'à 17 T, ce qui permet une résolution

spatiale beaucoup plus faible, ou encore le projet de Neurospin au CEA avec un IRM humain à 11,7 T.

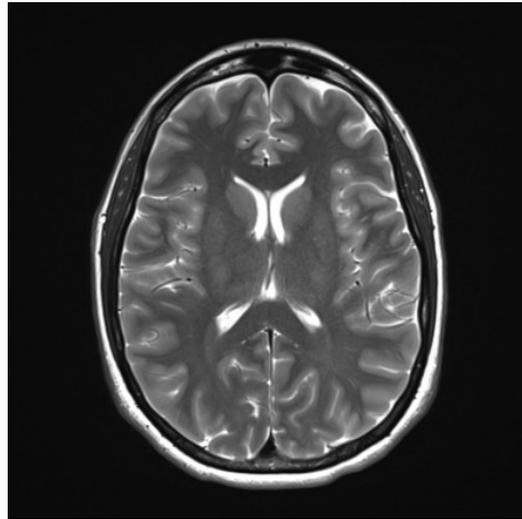


Figure 23. Imagerie par contraste T2 d'un cerveau humain, on voit en hypersignal le signal venant des ventricules contenant le liquide céphalospinal et du liquide présent entre la dure-mère et le cortex. Le reste des structures apparaît en hyposignal.

1.3.5.2. Angiographie par IRM

Après l'injection de chélates de gadolinium en voie intraveineuse, il devient possible, à l'aide de séquence d'écho de gradients rapide, d'imager le système vasculaire. En clinique, l'imagerie avec injection de gadolinium permet de détecter les anévrismes, hémorragie cérébrale, AVC, etc.

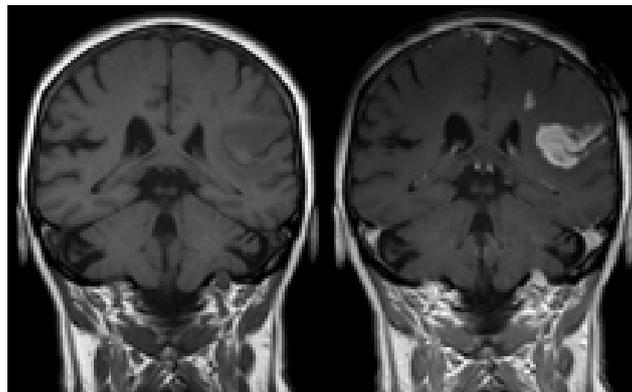


Figure 24. Imagerie par résonance magnétique avec injection de gadolinium. L'injection de gadolinium permet d'observer une rupture de la barrière hématoencéphalique suite à un accident vasculaire cérébral.[°]

[°] By Hellerhoff - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=10323803>

1.3.5.3. Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf ou fMRI)

L'IRM est aussi capable de détecter des changements d'activité dans le cerveau, c'est l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf ou fMRI en anglais)^f se basant sur la différence de nature magnétique entre l'oxyhémoglobine et la desoxyhémoglobine.

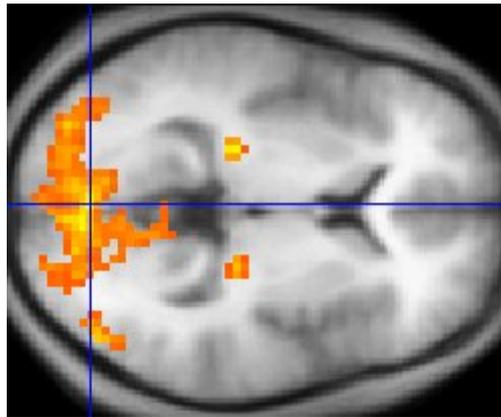


Figure 25. Imagerie fonctionnelle par résonance magnétique. Les zones en jaune marquent les zones fonctionnellement activées dans le cerveau lors d'une tâche⁵.

En effet, l'oxyhémoglobine n'est pas active en IRM, alors que la desoxyhémoglobine est paramagnétique et donc active en IRM. Le contraste d'activité magnétique entre HbO et Hb permet de déterminer l'activité métabolique (consommatrice d'oxygène) dans les tissus, c'est le signal BOLD pour Blood Oxygen-Level Dependant. En effectuant à haute vitesse des séquences T_2 , il devient possible de faire des images successives (environ toutes les demi-secondes) ce qui permet de reconstituer un film de l'activité du cerveau.

^f Par Washington iring sur Wikipédia anglais — Transféré de en.wikipedia à Commons.Travail personnel, Domaine public, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=24381>

1.3.6. Tomographie par émission de positon (TEP-scan ou PET-scan)

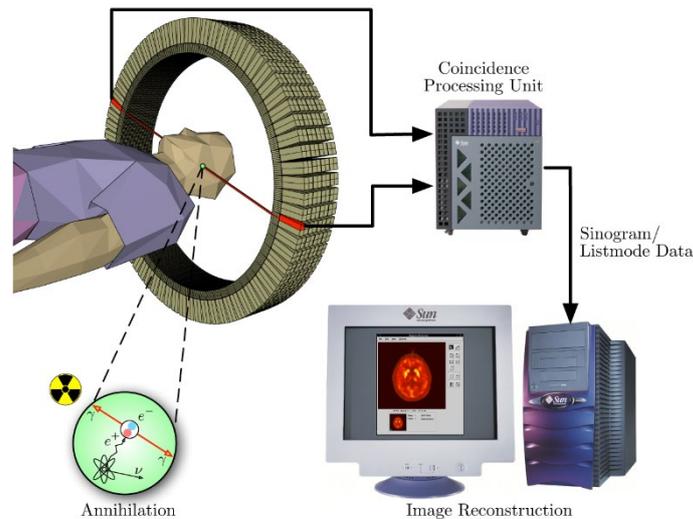


Figure 26. Tomographie par émission de positon : principe. Un radiotracteur injecté par voie intraveineuse se désintègre en émettant un positon qui permet à son tour des rayonnement gamma détectés par un détecteur circulaire autour du patient. Ensuite, une image peut être reconstruite, déterminant la concentration locale en radiotracteur et donc l'activité métabolique[§]

La tomographie par émission de positon repose sur l'injection d'un radiotracteur dans le corps pour suivre l'activité métabolique d'un ou plusieurs organes par l'émission de positon. Il est possible, en choisissant le radiotracteur que l'on injecte, de choisir ce que l'on va imager. Par exemple, l'injection de ^{18}F FDG (Fluorodexoxyglucose marqué au fluor 18) permet de visualiser l'activité métabolique impliquant le glucose dans le corps. Il est aussi possible d'utiliser d'autres radioisotopes pour imager d'autres fonctions comme l'oxygène 15 (utilisé pour déterminer le flux sanguin cérébral et la fonction d'extraction de l'oxygène³⁴), l'azote 13, le carbone 11.

La résolution spatiale du PET-scan est de l'ordre de 5 mm et sa résolution temporelle entre 1 minute et 10 minutes, ce qui en fait une technique lente. Cependant, elle est très utile dans le cadre de la mesure de l'activité métabolique et il s'agit de la seule technique permettant de la mesurer directement. Afin de palier à sa faible résolution spatiale, le PET-scan est souvent couplé à d'autres techniques d'imagerie, comme le CT-scan (PET-CT) dont nous parlerons dans la partie suivante, ou encore aux ultrasons³⁵ (PETRUS).

[§] Jens Maus (<http://jens-maus.de/>) — own work - part of master thesis http://jens-maus.de/ftp/langner_mscthesis.pdf http://jens-maus.de/ftp/langner_mscthesis.bib

1.3.7. Tomodensitométrie (CT-Scan)

La tomodensitométrie consiste à effectuer un scanner à rayon X de tout le corps sous tous les angles à l'aide d'un émetteur X et d'un récepteur tournant à grande vitesse autour du patient. La résolution spatiale d'un CT-scan est inférieure au millimètre et sa résolution temporelle n'est pas ou peu importante compte tenu de la nature des examens effectués en CT-scan, elle est cependant, pour un volume complet du corps, de l'ordre de 100ms. En injectant des produits de contraste à base d'iode par voie veineuse, il devient possible d'imager le système vasculaire, ce qui permet d'avoir des angiographies (cérébrales ou non). Cependant, la dose de radiation pour un CT scan corps entier est de l'ordre de 10 mSv, ce qui rend l'examen de tomodensitométrie fortement irradiant et demande une limitation du nombre de CT-scan par rapport à d'autres examens moins ou non irradiants (comme l'IRM)

1.3.8. Imagerie Ultrasonore

Si l'échographie est une technique très bien installée dans le paysage médical, notamment pour les échographies de suivi de la grossesse, il s'agit d'une technique relativement nouvelle dans le paysage de la neuroimagerie. Technique présentant l'avantage d'être rapide, portable, l'imagerie ultrasonore possède une très bonne résolution spatiale ($\sim 100\mu\text{m}$ à 15 MHz) et temporelle ($\sim 10^5$ Hz), nous décrirons cette technique et son application à la neuroimagerie plus en détail dans la partie suivante, ses avantages, inconvénients, etc.

1.4. Imagerie Fonctionnelle Ultrasonore

L'échographie est une technique très ancrée dans le paysage médical notamment pour sa capacité à être rapide et portable et à permettre une visualisation en temps réel des organes imagés, notamment pour le suivi de la grossesse. Nous allons, dans un premier temps, décrire les principes généraux de l'échographie, avant de nous intéresser plus particulièrement à l'échographie ultrarapide en ondes planes, technique principale de ce manuscrit, et nous éluciderons les principes de l'échographie fonctionnelle ultrasonore et de ses différentes applications.

1.4.1. Principe de l'échographie

Qu'elle soit conventionnelle ou en onde plane, l'échographie repose sur le principe de l'émission, par une barrette d'éléments piézoélectriques, d'une onde mécanique dans un milieu. L'onde mécanique émise par la barrette d'éléments piézoélectriques est une onde ultrasonore (dont la fréquence n'est pas audible, typiquement 15 MHz dans notre cas) et est une onde de compression se propageant à environ 1540 m/s dans le milieu biologique. La vitesse du son est considérée comme étant une constante en première approximation.

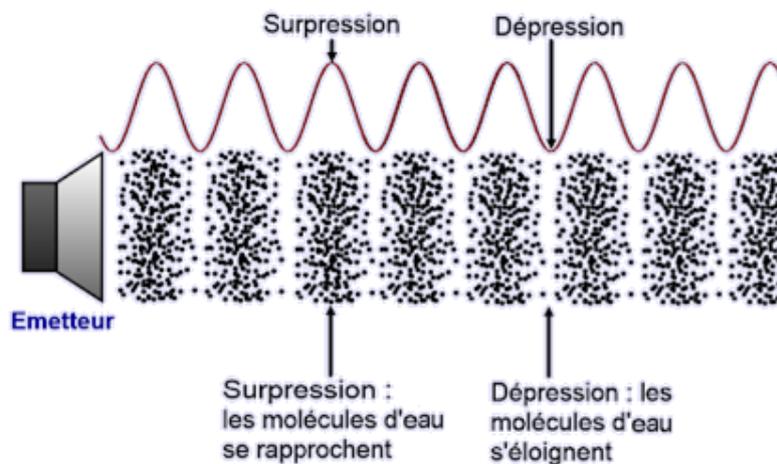


Figure 27. Lors de la propagation d'une onde ultrasonore dans un milieu, il se forme une alternance de zone de surpression et de dépression. Dans un milieu biologique standard, considéré comme de l'eau, les ondes ultrasonores ont une longueur d'onde typiquement égale à quelques centaines de micromètres pour une profondeur de pénétration de l'ordre de quelques centimètres.

Dans le cadre de l'échographie conventionnelle, des ultrasons sont focalisés dans le milieu à une certaine profondeur, puis l'écho rétrodiffusé est capté par la barrette piézoélectrique avant de permettre la formation d'une image. Ce procédé est appliqué colonne par colonne et permet la reconstruction d'une image d'échographie conventionnelle. Ce type d'imagerie, appelée imagerie B-mode, permet d'effectuer une mesure de l'échogénicité du milieu, dépendante de la nature physique du milieu (module de compressibilité, densité, etc.). Une des limitations de cette technique d'imagerie est la cadence d'imagerie, typiquement de l'ordre de 50 Hz, due à la formation de l'image colonne par colonne (généralement, une barrette ultrasonore comporte 128 éléments

piézoélectriques, ce qui donne 128 colonnes à imager pour former une image). En ce qui concerne des fréquences d'émissions des ondes ultrasonores, elles dépendent des applications. Pour une application médicale, on utilise en général des ondes aux alentours du MHz, pour les applications de recherche sur le petit animal, on utilise plutôt des fréquences d'émission autour de 15 MHz³⁶⁻³⁸, qui permettent d'avoir une meilleure résolution spatiale au prix d'une moins bonne pénétration dans le milieu (plus la fréquence est élevée, plus la résolution spatiale est meilleure (100µm à 15 MHz vs. 1.5mm à 1MHz) mais moins l'onde pénètre dans le milieu (environ 2cm à 15MHz contre une dizaine de centimètres pour 1MHz)).



Figure 28. Echographie d'un fœtus de 9 semaines. On observe bien la différence d'échogénicité entre le liquide amniotique et les tissus environnant.^h

Après nous être intéressés aux principes généraux de l'échographie, nous allons nous intéresser plus en détail à l'imagerie Doppler. Nous allons commencer par ses principes, puis rapidement à l'imagerie Doppler conventionnelle et finalement à l'imagerie Doppler ultrarapide à l'aide de l'échographie en onde plane.

1.4.2. Effet Doppler

L'imagerie ultrasonore conventionnelle permet d'imager l'échogénicité des milieux biologiques (Figure 28) , mais elle permet aussi d'imager le mouvement, par échographie Doppler. Si nous connaissons tous une expression tangible de l'effet Doppler, avec la moto qui arrive vers nous, dont le bruit devient plus aigu avant de s'éloigner de nous

^h Par Aoineko, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1026710>

avec le bruit devenant plus grave, nous pouvons nous demander qu'est-ce que l'effet Doppler appliqué à l'imagerie ultrasonore et quel est son utilité.

Il faut tout d'abord différencier deux effets Doppler, le Doppler continu et le Doppler pulsé.

1.4.2.1. Effet Doppler continu

L'effet Doppler continu est celui dont nous avons le plus l'habitude, il s'agit de la moto dont nous avons donné l'exemple ci-dessus. Dans le cadre de l'imagerie ultrasonore, le principe reste le même, une onde ultrasonore est émise en continu par un émetteur (généralement la moitié de la barrette ultrasonore par exemple) et est écoutée en continu par l'autre partie de la barrette. Si, sur le chemin de l'onde, se situe un écoulement de grande vitesse, l'onde va revenir avec une fréquence légèrement différente de sa fréquence d'émission. Le décalage fréquentiel entre l'onde émise et l'onde retour est directement proportionnelle à la vitesse de l'écoulement. L'avantage du Doppler continu est sa faculté de mesurer des vitesses très rapides (comme du sang aortique, de l'ordre de 1m/s et plus), mais il présente le désavantage majeur de ne pas pouvoir localiser la source. En effet, l'onde ultrasonore est émise en continu, et l'écho est écouté en continu, il est donc impossible de former une image et de localiser la source de l'écho.

Le Doppler pulsé, dont nous allons parler, présente l'avantage de pouvoir localiser les sources, au détriment de ne pas pouvoir mesurer des vitesses aussi rapide que le Doppler continu.

1.4.2.2. Effet Doppler pulsé

Sur un échographe n'est généralement pas utilisé l'effet Doppler continu mais plutôt l'effet Doppler pulsé. Le principe du Doppler pulsé n'est pas le même que le Doppler continu et ne peut pas être comparé à l'exemple de la moto que nous avons décrit plus tôt. Cependant, essayons de proposer une analogie similaire afin d'expliquer l'effet Doppler pulsé.

Imaginons notre moto, se déplaçant vers nous, nous nous considérerons comme source ultrasonore. Nous envoyons une onde ultrasonore sur cette moto, qui met un temps t_1 , directement dépendant de la distance qui nous sépare d'elle, à aller sur la moto, être réfléchi et revenir. Une fraction d'instant plus tard, une nouvelle onde est émise,

elle met un temps t_2 à aller sur la moto, être réfléchi et revenir. Puisque la moto se déplace vers nous, nous avons $t_2 < t_1$. La différence entre t_2 et t_1 est directement proportionnelle à la vitesse de la moto. En calculant cette différence de temps, il est possible de connaître la vitesse de la moto.

En appliquant le même principe non pas à l'imagerie d'une moto mais à l'imagerie ultrasonore des globules rouges se déplaçant dans les vaisseaux sanguins nous avons accès à la vitesse du sang dans les dits vaisseaux : c'est l'imagerie par effet Doppler pulsé.

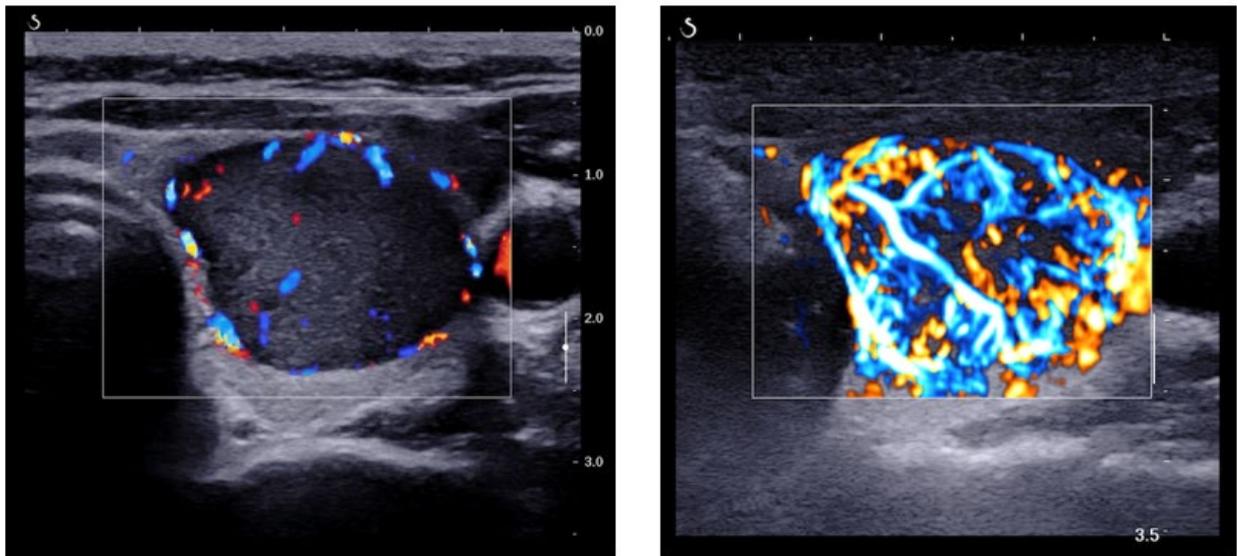


Figure 29. Imagerie Doppler pulsée, on observe la vascularisation des tissus obtenue grâce au Doppler pulsé en imagerie conventionnelle (par onde focalisée, à gauche, et en imagerie ultrarapide, à droite)

Notons cependant que cette technique, si elle présente des avantages indéniables comme l'accès à la location spatiale des sources, ne permet pas de mesurer des vitesses aussi rapides que l'échographie Doppler continu.

1.4.3. Echographie ultrarapide

L'échographie conventionnelle possède une limite intrinsèque qu'est sa cadence d'imagerie. En effet, si on considère le temps qu'il faut pour imager colonne par colonne pour former une image, on se retrouve limité à une cadence d'imagerie de l'ordre de 50 à 100 Hz en fonction de la profondeur d'imagerie. Si une telle cadence est largement suffisante pour la plupart des applications cliniques, elle ne permet pas d'imager finement

des phénomènes rapides. Pour cela, une nouvelle technique d'imagerie a été développée : l'imagerie ultrarapide. Le principe est non plus d'effectuer l'image colonne par colonne en utilisant des ultrasons focalisés mais d'insonifier le milieu dans son entièreté avec une onde plane. En écoutant les échos retours de l'onde plane, il devient possible de former, en une fois, une image complète du milieu. Il devient alors possible d'augmenter grandement la cadence d'imagerie (vers 5000 images/seconde) au prix d'un rapport d'un contraste dégradé par rapport à l'imagerie conventionnelle.

L'utilisation d'ondes planes avec différents angles pour insonifier le milieu permet d'améliorer la focalisation synthétique et le contraste de l'image, par sommation cohérente, comme nous le verrons dans la partie suivante.

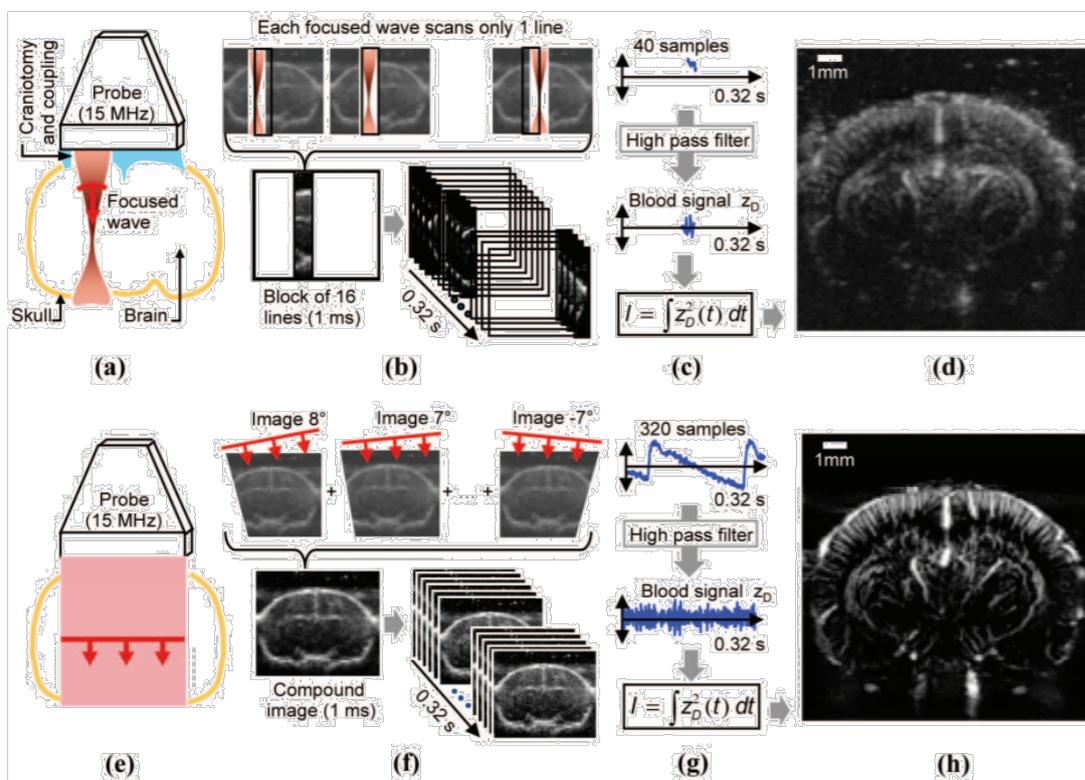


Figure 30. Comparaison entre l'échographie conventionnelle par onde focalisée et l'échographie par ondes planes. a) Imagerie colonne par colonne d'un cerveau de rat b) formation colonne par colonne de l'image, la cadence est faible, de l'ordre de 50Hz c) Calcul du Doppler de puissance après filtrage du signal obtenu pour ne conserver que le signal correspondant au sang. d) Image obtenue par imagerie conventionnelle e) Imagerie en onde plane : le milieu est insonifié d'un coup par une onde plane, au contraire de a). f) Sommation cohérente des images pour obtenir une image cohérente, la cadence est beaucoup plus élevée (~5000 Hz). g) Filtrage puis intégration pour obtenir le Doppler de puissance. h) image obtenue par imagerie Doppler ultrarapide.³⁹

1.4.4. Sommation cohérente

L'imagerie ultrarapide permet d'augmenter grandement la cadence d'imagerie au détriment de la qualité d'image. Afin d'améliorer les images ultrarapides, la technique de *sommation cohérentes d'ondes planes* ou *plane waves compounding*^{40,41}, a été mise au point. A la place de seulement émettre une onde plane, sont émises une salve d'ondes planes d'angles différents (typiquement -10° à 10° par pas de 2°) à très haute vitesse (la même vitesse que la cadence d'imagerie ultrarapide, *i.e.* 5 kHz) qui sont ensuite sommées de façon cohérente afin de réaliser une focalisation synthétique à l'émission.

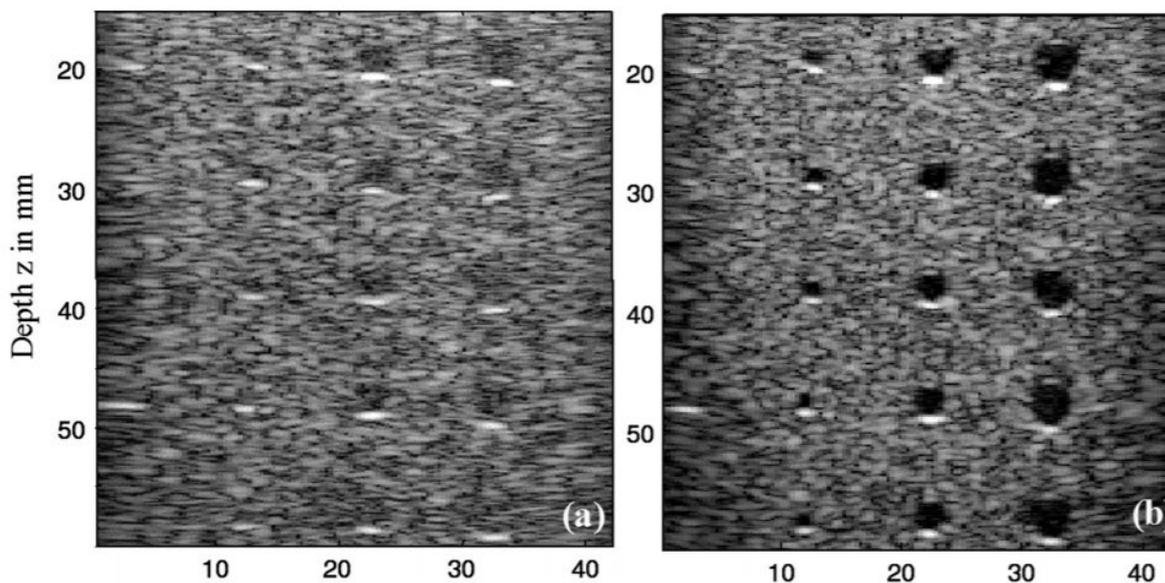


Figure 31. Comparaison entre un B-mode simple avec une seule plane wave (a) et 71 planes waves (tilt 0.47° entre chaque). On observe une grande augmentation du rapport signal à bruit en utilisant la sommation cohérente (d'après Montaldo et al., 2009)

Cette technique permet d'obtenir une image dont la qualité est identique à l'imagerie classique mais à des cadences bien plus rapides.

Pour passer d'un film d'images ultrarapides à une image de la vasculature des organes (dans notre cas, le cerveau), il convient de filtrer les données acquises pour mettre en évidence les mouvements des globules rouges

1.4.5. Filtrage des signaux ultrasonores

Une fois acquis les images ultrarapides, il convient de les filtrer pour extraire le signal venant du sang. Pour ce faire, nous pouvons utiliser deux techniques : la première mise en place est le filtrage temporel³⁶ puis a ensuite été proposée la méthode de *clutter filter* , ou filtrage spatiotemporel par décomposition en valeurs singulières⁴³.

1.4.5.1. Filtrage temporel

L'approche basée sur le filtrage temporel se base sur un principe simple : les fréquences Doppler des tissus et les fréquences Doppler du sang ne sont pas les mêmes, ce qui est particulièrement vrai pour les gros vaisseaux et artères. En effet, les tissus bougent relativement lentement, leur fréquence Doppler est donc faible, au contraire du sang dans les grosses artères, dont la fréquence Doppler est plus élevée.

Dans un cas idéal où il n'existe pas de recoupement entre les deux fréquences du tissu et du sang, il est aisé, en choisissant une fréquence de coupure f_c adaptée, de séparer le signal du tissu et le signal du sang par un filtrage passe-haut (voir Figure 30 H).

Si cette technique fonctionne plutôt bien pour les gros vaisseaux, elle est moins précise dans le cadre des capillaires. En effet, le sang se déplace beaucoup plus lentement dans un capillaire que dans une artère : la fréquence Doppler d'un globule rouge dans un capillaire est donc beaucoup plus faible que la fréquence Doppler du même globule rouge dans une artère. Il y a donc un recoupement entre les fréquences Doppler du tissu et les fréquences Doppler du sang : il ne devient plus possible de filtrer avec un simple passe-haut le signal venant du tissu et le signal venant du sang.

Pour pallier à ces difficultés de séparation du signal tissulaire et du signal sanguin a été mis au point une nouvelle méthode de filtrage, le filtrage par décomposition en valeur singulière ou *singular value decomposition* (SVD).

1.4.5.2. Filtrage spatiotemporel

Le filtrage purement temporel souffre de lacunes quand les fréquences Doppler du tissu et les fréquences Doppler du sang se superposent. Le filtrage spatiotemporel par décomposition en valeur singulière permet de profiter, en plus de l'aspect temporel du filtrage, de l'aspect spatial. En effet, le tissu est spatialement très cohérent, il se déplace uniformément et lentement au cours du temps sur toute l'image alors que le sang est peu spatialement cohérent : deux pixels d'une artère ne se déplacent pas de la même manière, il n'y a pas ou peu de cohérence spatiale. En effet, les globules rouges ne sont pas cohérents entre eux, ce sont des entités indépendantes se propageant dans les vaisseaux sanguins.

Le principe du filtrage par SVD est le suivant :

Soit un film Doppler à trois dimensions $(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{t})$. Cette matrice est réarrangée en une matrice à 2 dimensions appelée matrice de Casorati \mathbf{C} de dimension $(\mathbf{x}^* \mathbf{y}, \mathbf{t})$ où une dimension est donc l'aspect spatial de notre matrice du film Doppler et l'autre la dimension temporelle.

Sur cette matrice de Casorati \mathbf{C} est effectuée une décomposition en valeur singulière (ou SVD en anglais) et on obtient

$$\mathbf{C} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{V}$$

avec

- \mathbf{U} une base de vecteurs spatiaux de \mathbf{C}
- \mathbf{S} les vecteurs singuliers de \mathbf{C} , c'est une matrice de taille $(\mathbf{x}^* \mathbf{y}, \mathbf{t})$ dont les valeurs sont situées sur les couples (i, i)
- \mathbf{V} une base des vecteurs temporels de \mathbf{C}

Puisque \mathbf{U} et \mathbf{V} sont des bases de vecteurs, on peut écrire que :

$$\sum_i U_i S_i V_i$$

où U_i est la $i^{\text{ème}}$ colonne de \mathbf{U} , de même pour S_i et V_i . Les S_i correspondent à l'énergie des vecteurs spatiaux et temporels correspondant. Dans notre cas, les premières valeurs (donc les premiers i) correspondent aux modes de grande cohérence spatiotemporelle : le

tissu. Les valeurs qui suivent vont correspondre aux plus faibles valeurs de cohérence spatiotemporelle qui correspond dans notre cas aux valeurs du sang.

On peut alors définir une « valeur de coupure » de notre signal ($n = 60$ pour le rat, $n = 30$ pour le primate non-humain), permettant d'éliminer le signal venant des tissus pour ne garder que le signal venant des vaisseaux sanguins. Les images obtenues en utilisant cette méthode de filtrage du signal sont de bien meilleure qualité que les images obtenues avec un simple filtre passe-haut notamment pour les petits flux sanguins ou bien en présence de mouvement du tissu.

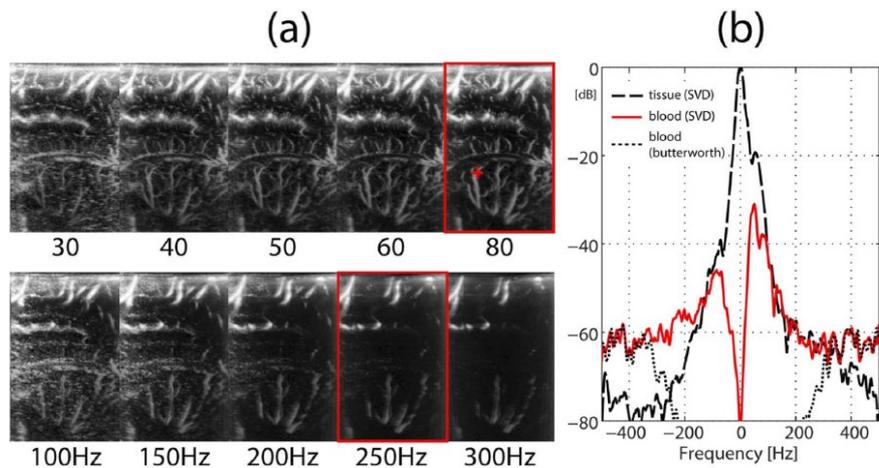


Figure 32. Comparaison entre le filtrage temporel et le filtrage par SVD dans le cadre d'une acquisition avec un fort mouvement d'après Demené et al.⁴³. On remarque que le filtrage SVD rend une image de meilleure définition que le filtrage temporel (a). b) Densité spectrale en dB du sang obtenu par filtrage SVD (en rouge) et obtenu par le filtrage passe-haut de Butterworth (pointillé noir).

Le filtrage SVD dépend entièrement du paramètre λ_{cut} qui a été précédemment défini à $\lambda = 60$. Cependant, cette valeur n'est pas optimale pour toutes les acquisitions et ce paramètre peut être modifié en fonction des vitesses de flux dans les vaisseaux. Une technique particulière de « SVD adaptative à seuil automatique » a été proposée⁴⁴ en 2018 par l'étude de la matrice ${}^tU.U$ et permet de déterminer le λ optimal pour les différentes acquisitions. Cet algorithme nous permet de déterminer $\lambda = 60$ pour notre étude chez le rat et $\lambda = 30$ pour notre étude chez le primate non-humain.

1.4.6. Imagerie fonctionnelle ultrasonore.

Comme nous avons décrit précédemment les principes de visualisations indirectes de l'activité neuronale par le biais de son activité métabolique et du couplage neurovasculaire (1.2.6 et 1.3.5.3), il est aussi possible d'effectuer ces visualisations à l'aide de l'imagerie ultrasonore. En effet, nous avons vu dans les chapitres précédents que l'imagerie ultrasonore est sensible à la quantité locale de diffuseurs ultrasonores et que nous sommes capable, en utilisant un filtrage adapté, de ne garder que le signal venant des diffuseurs du sang.

Lors du couplage neurovasculaire, la quantité locale de sang augmente dans les capillaires concernés par la vasodilatation, apportant avec ceux une quantité accrue de globules rouges jouant le rôle de nos diffuseurs ultrasonores. Il devient alors possible de visualiser non seulement qualitativement mais aussi quantitativement l'activité neurovasculaire locale et donc de faire de l'imagerie *fonctionnelle* ultrasonore^{31,32,39}.

L'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS pour functional UltraSound) a débuté chez l'animal anesthésié ayant subi une craniotomie (c'est-à-dire l'ablation d'une partie du crâne)³⁶ pour s'affranchir du problème de l'os, les ultrasons n'étant pas capable de passer ce dernier chez le rat. Cependant, l'utilisation d'agent de contraste ultrasonore (microbulle de SF₆) permet de passer outre la limitation de la présence de l'os chez le petit animal⁴⁶ et chez la souris ou le rat juvénile, il est même possible de s'affranchir des agents de contraste et d'imager à travers l'os du crane qui reste suffisamment fin⁴⁷.

Chez le primate non humain, l'imagerie fonctionnelle n'est pas possible en transcranien, il faut obligatoirement effectuer une trépanation similaire à celle des chambres d'enregistrement pour l'électrophysiologie³⁸ afin de pouvoir observer l'activité fonctionnelle. L'imagerie chez le primate non-humain présente l'avantage de pouvoir étudier l'animal éveillé effectuant une tâche cognitive pour laquelle ils ont été entraînés, permettant d'élucider des mécanismes cognitifs complexes.

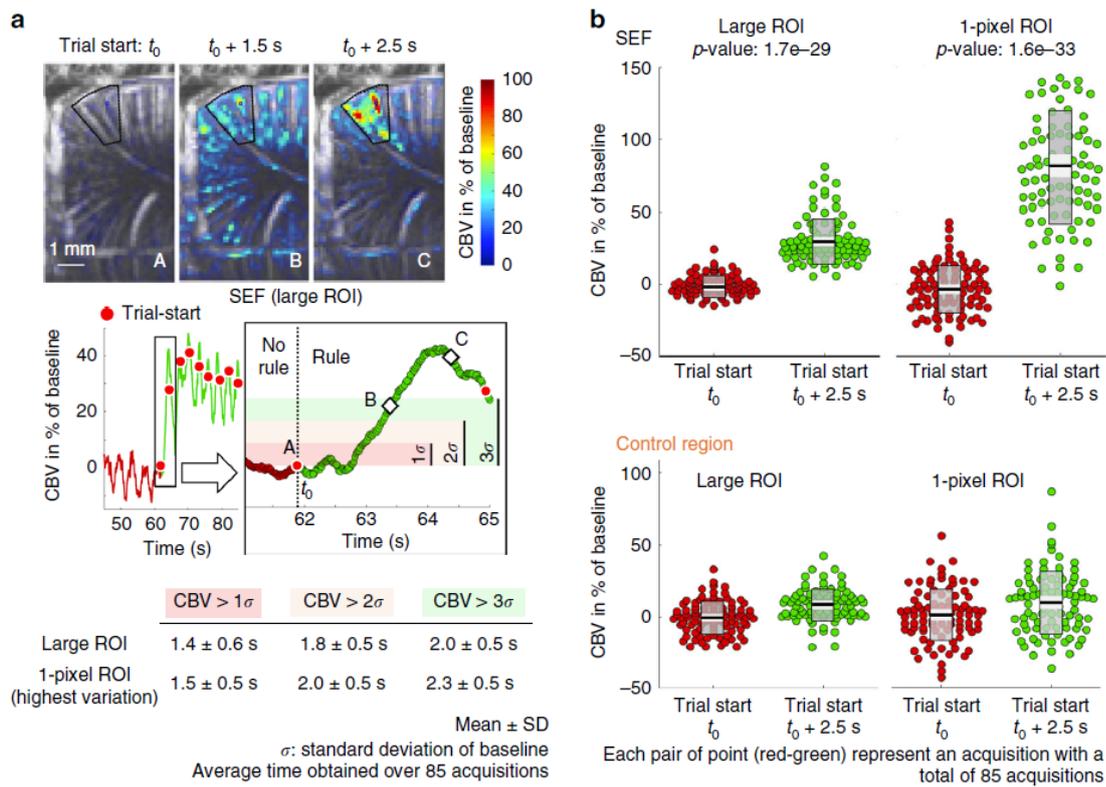


Figure 33. Imagerie fonctionnelle ultrasonore chez le primate non-humain d'après Dizeux *et al.* (2019). a) Activation fonctionnelle dans le Supplementary Eye Field (SEF) lors du début d'une tâche au cours du temps. Le panel du bas détermine le seuil de détectabilité à partir duquel il est possible de déterminer la présence d'une activation fonctionnelle. b) Quantification des activations fonctionnelles chez les primates entre la ligne de base (rouge) et la tâche (vert) pour une zone d'intérêt (ROI) large et pour un unique pixel. Dans le SEF, on observe une activation fonctionnelle qui n'est pas présente dans une zone contrôlée (panel du bas).

Finalement, l'imagerie fonctionnelle a aussi été effectuée chez l'Homme. Même si les ultrasons sont fortement atténués et aberrés par le crâne, il existe des cas où l'os n'est pas présent. Le premier cas se présente chez les nouveaux nés. En effet, les os du crâne du nouveau-né ne sont pas entièrement soudés et il existe un trou à l'apex du crâne appelé fontanelle permettant le passage des ultrasons. L'imagerie fonctionnelle ultrasonore est alors possible chez le nouveau-né en passant par la fontanelle^{48,49} et permet l'étude, chez les prématurés, de possibles lésions. Un autre cas où l'imagerie fonctionnelle ultrasonore est possible chez l'homme est le cadre peropératoire : lors de l'ablation chirurgicale de tumeurs cérébrales, il convient de faire une carte fonctionnelle du cerveau afin de minimiser les dommages collatéraux. Il a été montré que les ultrasons utilisés en peropératoire pendant une opération chirurgicale offrent une modalité rapide et plus pratique que l'IRM peropératoire pour la cartographie cérébrale au bloc⁵⁰.

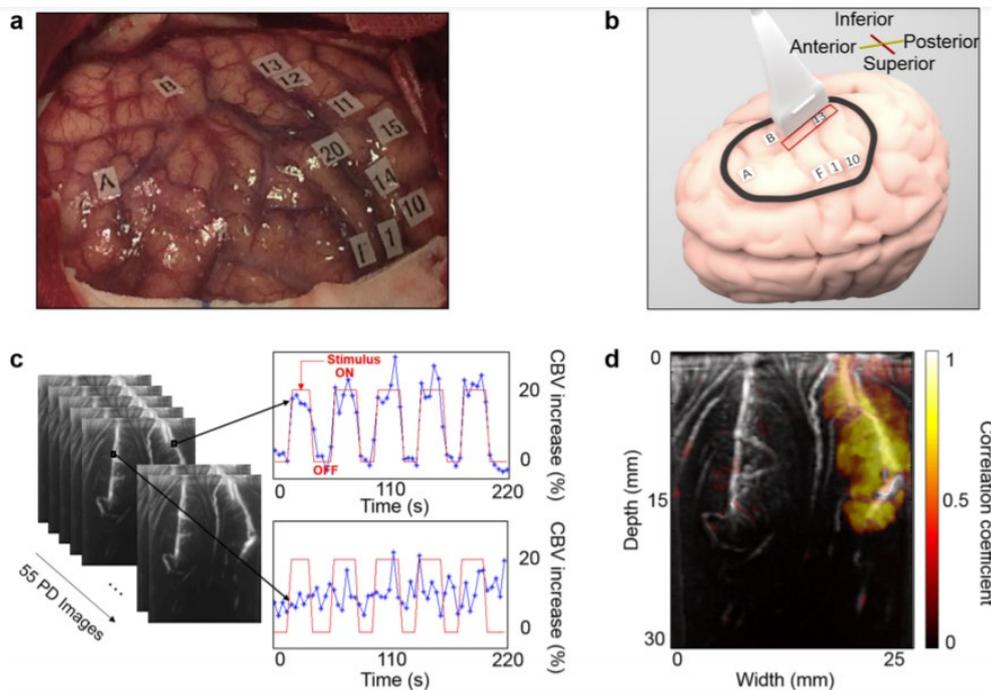


Figure 34. Imagerie fonctionnelle péropératoire chez l'Homme, d'après Imbault *et al.* (2017). a) Photographie de la cartographie du cerveau pendant une opération chirurgicale. b) Schéma description du positionnement de la sonde ultrasonore au sein de la trépanation effectuée chez le patient. c et d) Zone activée par le mouvement de la bouche chez le patient et sa comparaison à une zone contrôle, en corrélation.

1.5. Objectifs de la thèse

Le fil conducteur de ce travail de recherche est l'étude du système nerveux central et de l'intégration d'informations en provenance du système nerveux périphérique à l'aide de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore en utilisant différents modèles animaux, ici le rat de laboratoire et le macaque rhésus. Ce travail commence par l'étude de l'intégration d'informations nociceptives par la moelle épinière chez le rat de laboratoire, tant dans un contexte physiologique normal que dans un contexte de douleur inflammatoire et donc physiopathologique. Par la suite, nous nous intéressons à une autre espèce animale, le macaque rhésus, où nous étudions des mécaniques de plus haut niveau dans la cognition, en commençant par la quantification de l'effort cognitif dans des tâches oculomotrices et à ses marqueurs dans une zone du cerveau : les champs oculomoteurs supplémentaires (supplementary eye field ou SEF en anglais) lors d'une tâche de saccades et d'antisaccades réalisées par l'animal fixé en chaise de contention. Par la suite, nous étudions une zone plus profonde du cerveau dans le même plan, le cortex cingulaire antérieur, qui se révèle être impliqué dans la volition du primate non-humain, notamment dans la « volonté de reprendre la tâche » lors d'une pause soutenue pendant un paradigme de travail. Finalement, les travaux toujours en cours étudient la capacité de coupler l'imagerie ultrasonore à l'électrophysiologie pour étudier à la fois au niveau du neurone ou des potentiels de champs locaux et au niveau plus macroscopique que nous offre l'imagerie ultrasonore les couplages entre l'activité neuronale et vasculaire.

1.5.1. Imagerie fonctionnelle ultrasonore de la moelle épinière

La moelle épinière est le premier relai des informations en provenance du système nerveux périphérique, que ce soit pour les informations comme la proprioception ou les informations tactiles, douloureuses, etc. Si l'IRMf présente l'avantage de permettre une étude non invasive de la moelle épinière, elle présente le désavantage de sa résolution spatiale, rendant difficile l'étude de cette dernière (offrant soit une mauvaise résolution spatiale, soit demandant une IRM à haut champ). Le fUS présente ici un double avantage : sa résolution spatiale, de l'ordre de la centaine de micromètres, et sa résolution temporelle, de l'ordre de 2.5 Hz après moyennage, permettent l'étude de la moelle épinière du petit animal avec une excellente résolution spatio-temporelle au prix de la perte du côté non invasif, les ultrasons ne passant pas les os, une laminectomie devient nécessaire.

Du fait de sa petite taille chez le petit animal, un nombre très réduit d'études existent sur la moelle épinière du rat et nous nous proposons ici d'étudier les entrées du système nerveux périphérique dans la moelle épinière, dans un régime physiologique (pour des stimulations mécaniques naturelles et des stimulations calibrées électriques) et physiopathologique en comparant les réponses hémodynamiques dans un cas basal et dans un cas d'inflammation locale forte induite par adjuvant de Freund complet pour les stimulations tactiles naturelles uniquement. Du fait de la bonne résolution spatiale offerte par le fUS, nous proposons aussi une étude anatomique comparée de la moelle épinière, obtenue par super-résolution ultrasonore et sa comparaison avec l'anatomie obtenue par imagerie optique ex-vivo.

Nous nous tournons ensuite vers un modèle d'intégration plus complexe, prenant en compte la cognition et le comportement en passant du rat au primate non-humain pour étudier d'autres entrées du système nerveux périphériques vers le système nerveux central : la vision.

1.5.2. Imagerie fonctionnelle des champs oculomoteurs supplémentaires chez le primate non-humain

Si le rat est un excellent modèle de par sa disponibilité, ses facultés oculomotrices sont très limitées, alors qu'il est possible, chez le primate non-humain, d'étudier plus finement les mouvements oculomoteurs qui nous servent tous les jours à explorer notre environnement, et d'imager les zones corticales responsables de la supervision de ces mêmes mouvements. Concernant le rat, il ne s'agit pas d'un modèle permettant l'étude de mécanismes cognitifs complexes, impliquant par exemple l'apprentissage de tâches. Le modèle du primate non-humain, plus précisément du macaque rhésus *macaca mulatta* permet de répondre à cette problématique en autorisant l'imagerie ultrasonore chez un animal éveillé réalisant une tâche cognitive complexe, dans notre cas, une tâche visuelle cognitive complexe.

L'œil est un organe qui doit sa mobilité, chez le primate, à 6 muscles oculomoteurs. Ces muscles oculomoteurs permettent divers mouvements dont le mouvement important de saccade, permettant de faire en sorte qu'un objet soit et se maintienne dans la fovéa de la rétine. Les saccades peuvent être réflexes, dans le cas où l'objet apparaît brusquement dans le champ visuel, ou volontaires, par exemple pour permettre de choisir une mise au point sur une partie précise du champ visuel. Dans notre cas, notre paradigme d'étude

se base sur les saccades volontaires, contrôlées par trois aires : les champs oculomoteurs frontaux, les champs oculomoteurs supplémentaires et le cortex pariétal postérieurⁱ. De ces trois zones, nous choisissons d'étudier les champs oculomoteurs supplémentaires, responsables de l'attention visuelle (ou saillance) et du contrôle des saccades.

1.5.2.1. L'activité des champs oculomoteurs supplémentaires chez le primate non-humain reflète l'effort cognitif lors de tâches oculomotrices.

Grâce aux fenêtres d'électrophysiologie effectuée chez les primates non-humains, il devient possible d'effectuer, en temps réel et pendant une tâche cognitive, de l'imagerie ultrasonore. En utilisant d'autres appareils, telle une caméra utilisée pour suivre le mouvement des yeux et enregistrer le diamètre de la pupille, il devient aussi possible d'enregistrer, en temps réel et avec l'imagerie ultrasonore toute une batterie de paramètres comportementaux.

Entre autre, le diamètre de la pupille est connu⁵¹⁻⁵⁴ pour refléter l'engagement cognitif dans une tâche et ce dernier réagit aussi à la récompense gagnée à la fin d'une tâche. Nous montrons que le SEF, région du cortex prémoteur, reflète aussi une activité directe de la motivation du primate non-humain dans sa tâche oculomotrice et que cette activité est corrélée à l'activité pupillaire. Nous montrons qu'il est aussi possible de contrôler cette activité, tant vasculaire que pupillaire en modulant à notre guise la récompense afin de choisir le niveau d'activité du SEF avec une plus forte affinité pour l'augmentation de récompense que pour une diminution.

ⁱ http://ipubli-inserm.inist.fr/bitstream/handle/10608/5167/MS_2004_2_225.html

1.5.2.2. L'activité du cortex cingulaire antérieur présage un essai volontaire de reprise de tâche chez le primate non-humain

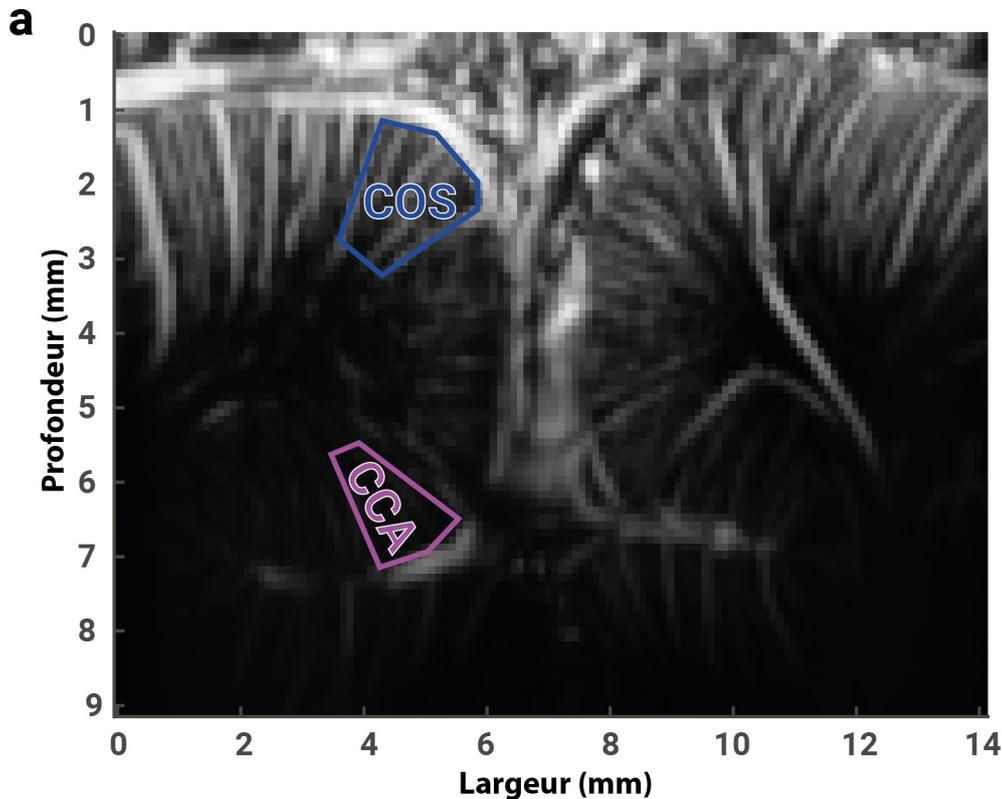


Figure 35. Image obtenue par Doppler ultrasensible chez le primate non-humain avec les champs oculomoteurs supplémentaires (COS) et le cortex cingulaire antérieur (CCA). Le COS est responsable de la supervision des mouvements oculomoteurs tandis que le CCA joue un rôle dans la gestion des émotions.

Dans le même plan d'imagerie que notre zone choisie pour cette étude se trouve le cortex cingulaire antérieur (Figure 35) (CCA ou ACC pour Anterior Cingular Cortex) jouant un rôle dans la prise de décision, dans l'attente et la réception de la récompense, et possède un rôle dans la gestion des émotions. Ce site, beaucoup moins lié aux mouvements oculomoteurs que le SEF que nous étudions en 1.5.2.1 possède néanmoins de remarquables propriétés.

Les primates non-humains effectuant une tâche l'effectuent généralement sur une durée allant d'une heure à une heure et demie, mais non sans pauses, la tâche étant relativement fatigante malgré l'entraînement. Similaire au *beireitshaftpotential* (BP) ou potentiel « de disponibilité » de l'expérience de Libet en 1965, nous mesurons une augmentation de l'activité dans l'ACC avant que le primate ne choisisse volontairement de terminer sa pause et de reprendre la tâche. L'étude de cet équivalent vasculaire du BP est rendue possible par l'imagerie fUS et sa capacité de travailler sur des essais uniques, ce que n'est

pas capable de faire l'IRMf, nous offrant une méthode de mesure d'une facette de la volonté propre du primate non-humain.

1.5.3. Couplage de deux techniques de mesure de l'activité cérébrale : fUS et électrophysiologie.

Comme nous l'avons vu précédemment, le fUS, comme l'IRM, ne donne qu'une mesure indirecte de l'activité neuronale à travers le couplage neurovasculaire. Dû à des problèmes de compatibilité électromagnétique, il est très difficile de coupler une technique de mesure directe de l'activité neuronale, l'électrophysiologie, à l'IRM²⁸. Le fUS offre l'avantage de ne pas présenter d'incompatibilité électromagnétique avec l'électrophysiologie et, même si le fUS est invasif, il est nécessaire de faire une trépanation pour l'électrophysiologie. Dans notre cas, nous cherchons à explorer l'origine du signal Doppler à travers la mesure simultanée de l'activité neuronale et de l'activité par Doppler chez le primate non-humain effectuant une tâche cognitive complexe de saccades et antisaccades. Grâce à l'imagerie ultrasonore, nous sommes capables d'imager et de localiser, en temps réel, la position de la microélectrode dans le cerveau, autorisant un positionnement fin de celle-ci dans le cerveau du primate non-humain. Nous montrons également que le signal neuronal précède toujours le signal fUS et qu'il existe une décorrélation (au moins partielle) entre le taux de décharge moyen du neurone dans le temps (sa fonction de densité de décharge, ou Spike Density Function (SDF) en anglais), invariante au cours du temps, et la réponse fUS qui décroît au cours du temps, tant d'un point de vue des temps longs par une baisse générale de la ligne de base que des temps courts avec une réponse d'amplitude plus faible.

1.6. Bibliographie du chapitre

1. Adams, F. *The genuine works of Hippocrates*; (New York, W. Wood and company, 1886).
2. Davis, M. C., Griessenauer, C. J., Bosmia, A. N., Tubbs, R. S. & Shoja, M. M. The naming of the cranial nerves: A historical review. *Clin. Anat.* **27**, 14–19 (2014).
3. Galien, C. *On the doctrines of Hippocrates and Plato , Third part : Commentary and indexes.* (Akademie Verl, 2005).
4. Al-Rodhan, N. R. F. & Fox, J. L. Al-Zahrawi and Arabian neurosurgery, 936–1013 ad. *Surg. Neurol.* **26**, 92–95 (1986).
5. Aciduman, A., Arda, B., Özaktürk, F. G. & Telatar, Ü. F. What does Al-Qanun Fi Al-Tibb (The Canon of Medicine) say on head injuries? *Neurosurg. Rev.* **32**, 255–263 (2009).
6. Nanda, A., Khan, I. S. & Apuzzo, M. L. Renaissance Neurosurgery: Italy’s Iconic Contributions. *World Neurosurg.* **87**, 647–655 (2016).
7. Galvani, L. De viribus electricitatis in motu musculari : Commentarius. *Bologna Tip Ist. Delle Sci.* 1791 58 P 4 Tavv F T 4 DCCf70 (1791).
8. Cohen, L., Smith, M. & Leroux-Hugon, V. Paul Broca’s thermometric crown. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **75**, 32 (2004).
9. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1906. *NobelPrize.org*
<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1906/summary/>.
10. Batista-García-Ramó, K. & Fernández-Verdecia, C. I. What We Know About the Brain Structure–Function Relationship. *Behav. Sci.* **8**, (2018).

11. Introduction - Anatomy and Physiology - OpenStax.
<https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/1-introduction>.
12. Sultan, F. Analysis of mammalian brain architecture. *Nature* **415**, 133–134 (2002).
13. McGann, J. P. Poor Human Olfaction is a Nineteenth Century Myth. *Science* **356**, (2017).
14. Uylings, H. B. M., Groenewegen, H. J. & Kolb, B. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res.* **146**, 3–17 (2003).
15. Ginhoux, F. & Prinz, M. Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, (2015).
16. Pfeiffer, T. & Attwell, D. Brain's immune cells put the brakes on neurons. *Nature* **586**, 366–367 (2020).
17. Philips, T. & Rothstein, J. D. Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *J. Clin. Invest.* **127**, 3271–3280.
18. Bélanger, M., Allaman, I. & Magistretti, P. J. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metab.* **14**, 724–738 (2011).
19. Brown, A. M. & Ransom, B. R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* **55**, 1263–1271 (2007).
20. Farhy-Tselnicker, I. & Allen, N. J. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Develop.* **13**, (2018).
21. Byrne, J. H. *The Oxford handbook of invertebrate neurobiology.* (2019).
22. Spruston, N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 206–221 (2008).

23. Meinecke, D. L. & Peters, A. GABA immunoreactive neurons in rat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* **261**, 388–404 (1987).
24. Isaacson, J. S. & Scanziani, M. How Inhibition Shapes Cortical Activity. *Neuron* **72**, 231–243 (2011).
25. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500–544 (1952).
26. Iadecola, C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer’s disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 347–360 (2004).
27. Angelo, M. Sulla circolazione del sangue nel cervello dell’uomo : ricerche sfigmografiche. *Wellcome Collection* <https://wellcomecollection.org/works/rjhn3gtu>.
28. Logothetis, N. K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T. & Oeltermann, A. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* **412**, 150–157 (2001).
29. Mullinger, K. J., Mayhew, S. D., Bagshaw, A. P., Bowtell, R. & Francis, S. T. Evidence that the negative BOLD response is neuronal in origin: A simultaneous EEG–BOLD–CBF study in humans. *NeuroImage* **94**, 263–274 (2014).
30. Bell, A. H., Miller, S. L., Castillo-Melendez, M. & Malhotra, A. The Neurovascular Unit: Effects of Brain Insults During the Perinatal Period. *Front. Neurosci.* **13**, (2020).
31. Muoio, V., Persson, P. B. & Sendeski, M. M. The neurovascular unit – concept review. *Acta Physiol.* **210**, 790–798 (2014).
32. Adkins, C., Barber, K. & Lockman, P. Crossing the barrier: The role of the blood-brain barrier in treating mental illness. *Biochemist* **35**, 4 (2013).

33. Dégenétais, E., Thierry, A.-M., Glowinski, J. & Gioanni, Y. Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* **12**, 1–16 (2002).
34. Horitsugi, G. *et al.* Oxygen-15 labeled CO₂, O₂, and CO PET in small animals: evaluation using a 3D-mode microPET scanner and impact of reconstruction algorithms. *EJNMMI Res.* **7**, (2017).
35. Provost, J. *et al.* Simultaneous positron emission tomography and ultrafast ultrasound for hybrid molecular, anatomical and functional imaging. *Nat. Biomed. Eng.* **2**, 85–94 (2018).
36. Macé, E. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat. Methods* **8**, 662–664 (2011).
37. Osmanski, B. F. *et al.* Functional ultrasound imaging reveals different odor-evoked patterns of vascular activity in the main olfactory bulb and the anterior piriform cortex. *NeuroImage* **95**, 176–184 (2014).
38. Dizeux, A. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates. *Nat. Commun.* **10**, 1–9 (2019).
39. Mace, E. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **60**, 492–506 (2013).
40. Montaldo, G., Tanter, M., Bercoff, J., Bencech, N. & Fink, M. Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **56**, 489–506 (2009).
41. Tanter, M., Bercoff, J., Sandrin, L. & Fink, M. Ultrafast compound imaging for 2-D motion vector estimation: application to transient elastography. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **49**, 1363–1374 (2002).

42. Bercoff, J. *et al.* Ultrafast compound Doppler imaging: providing full blood flow characterization. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **58**, 134–147 (2011).
43. Demené, C. *et al.* Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity. *IEEE Trans. Med. Imaging* **34**, 2271–2285 (2015).
44. Baranger, J. *et al.* Adaptive Spatiotemporal SVD Clutter Filtering for Ultrafast Doppler Imaging Using Similarity of Spatial Singular Vectors. *IEEE Trans. Med. Imaging* **37**, 1574–1586 (2018).
45. Mace, E. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **60**, 492–506 (2013).
46. Errico, C. *et al.* Transcranial functional ultrasound imaging of the brain using microbubble-enhanced ultrasensitive Doppler. *NeuroImage* **124**, 752–761 (2016).
47. Tiran, E. *et al.* Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent. *Ultrasound Med. Biol.* **43**, 1679–1689 (2017).
48. Demene, C. *et al.* Functional ultrasound imaging of brain activity in human newborns. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
49. Demené, C., Mairesse, J., Baranger, J., Tanter, M. & Baud, O. Ultrafast Doppler for neonatal brain imaging. *NeuroImage* **185**, 851–856 (2019).
50. Imbault, M., Chauvet, D., Gennisson, J.-L., Capelle, L. & Tanter, M. Intraoperative Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity. *Sci. Rep.* **7**, 1–7 (2017).

51. Alnæs, D. *et al.* Pupil size signals mental effort deployed during multiple object tracking and predicts brain activity in the dorsal attention network and the locus coeruleus. *J. Vis.* **14**, 1–1 (2014).
52. Murphy, P. R., Robertson, I. H., Balsters, J. H. & O’connell, R. G. Pupillometry and P3 index the locus coeruleus–noradrenergic arousal function in humans. *Psychophysiology* **48**, 1532–1543 (2011).
53. Joshi, S., Li, Y., Kalwani, R. M. & Gold, J. I. Relationships between Pupil Diameter and Neuronal Activity in the Locus Coeruleus, Colliculi, and Cingulate Cortex. *Neuron* **89**, 221–234 (2016).
54. Murphy, P. R., O’Connell, R. G., O’Sullivan, M., Robertson, I. H. & Balsters, J. H. Pupil diameter covaries with BOLD activity in human locus coeruleus. *Hum. Brain Mapp.* **35**, 4140–4154 (2014).

Chapitre 2. Imagerie fonctionnelle de la moelle épinière chez le rat.

La moelle épinière est le premier relai de l'intégration et de modulation d'informations nociceptives. L'imagerie fonctionnelle de la moelle épinière que ce soit chez le petit animal¹⁻⁸ ou même chez l'homme⁹⁻¹⁴ est une expérimentation difficile, de par sa petite taille, (de l'ordre de grandeur de 2 à 3 millimètres et de l'ordre du centimètre chez l'homme), mais aussi à cause de sa protection par la colonne vertébrale. Si l'IRM peut permettre cette imagerie de façon non invasive, elle offre une résolution spatiotemporelle limitée pour ces expériences. *A contrario*, l'imagerie ultrasonore offre une bonne résolution spatiotemporelle mais les ondes étant atténuées par les os, elle nécessite un accès direct à la moelle, *via* une laminectomie. Malgré un intérêt évident de l'imagerie de la moelle épinière, celle-ci étant le centre d'intégration de la nociception, l'imagerie fonctionnelle de cette structure est un domaine où les études sont bien moins nombreuses que pour le cerveau. Nous allons, dans ce chapitre, tirer partie de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore, pour étudier la physiologie du couplage neurovasculaire médullaire et sa physiopathologie dans un domaine de douleur inflammatoire.

Nous commencerons par une brève introduction sur la nociception, ses origines et sa neurophysiologie avant de nous intéresser plus particulièrement à la moelle épinière en tant que premier relai de l'information douloureuse, puis nous décrirons les différents résultats obtenus de cette étude chez le rat : anatomie, stimulations naturelles, électriques, somatotopie, pour finir par l'étude de stimulations naturelles nociceptives dans un modèle de douleur inflammatoire.

2.1. Introduction

Du latin *dolor* (douleur, peine, mal), la douleur est définie comme une sensation physique anormale et pénible ressentie dans une partie du corps^j (Académie Française). L'association internationale pour l'étude de la douleur (ou IASP : *International Association for the Study of Pain*) définit la douleur comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée avec des dommages tissulaires actuels ou à venir.

^j <https://www.dictionnaire-academie.fr/article/A9D3157>

L'IASP ajoute que la douleur est une expérience personnelle, dépendante de facteurs biologiques, psychologique et sociaux. Dans cette introduction, nous commencerons par étudier la physiologie et la physiopathologie de la douleur, et surtout de la nociception (perception des stimulations génératrices de douleur) avant de nous intéresser à la moelle épinière plus en particulier, sujet d'étude de ce chapitre.

2.2. Neurophysiologie de la somesthésie

Dans le but de comprendre ce qu'est la nociception, nous allons tout d'abord commencer par décrire la genèse d'une information sensitive, à travers les différents récepteurs de la peau, la transmission de ces informations à travers les fibres afférentes primaires, puis au premier site d'intégration de ces informations, soit dans la moelle épinière, soit dans les noyaux des colonnes dorsales. Nous nous intéresserons ensuite à la nociception plus en détail, à travers les nocicepteurs, puis au transport de ces informations à travers les fibres afférentes primaires, intégration dans la moelle épinière avant de, brièvement, décrire l'intégration par les centres supérieurs du cerveau de l'information nociceptive en douleur.

2.2.1. Sensibilité non nociceptive

La sensibilité non nociceptive est responsable des sensations tactiles et thermiques que nous ressentons à travers la peau, sans ressentir aucune nociception (attraper un objet, toucher un objet tiède, etc.). Un grand nombre de récepteurs de la peau, séparés en plusieurs groupes, sont responsables de la genèse de ces informations. Nous commencerons par décrire les récepteurs de la peau, tant mécanique que thermique, avant de nous intéresser aux fibres afférentes primaires qui vont conduire ces informations et aux voies subséquentes de leur transport jusqu'au cerveau.

2.2.1.1. *Les récepteurs de la peau*

Les mécanorécepteurs

La peau est responsable du toucher, à travers différents mécanorécepteurs placés dans le derme, sous l'épiderme, représentant la surface de la peau. Ces différents mécanorécepteurs sont responsables entre autres des sensations tactiles telles que le tact, la pression, les étirements de la peau. Les mécanorécepteurs sont classés en fonction de

leur type de réponse à un stimulus, il existe ainsi les récepteurs phasiques (ou dynamiques) qui renseignent sur les variations des stimuli au cours du temps et les récepteurs toniques (ou statiques) qui vont renseigner sur l'intensité des stimuli et leurs durées. Au niveau de la peau, nous pouvons différencier quatre grandes familles de mécanorécepteurs :

- Les corpuscules de Paccini (phasiques à champ récepteur étendu) sont responsables de la sensibilité à la vibration (et dans une moindre mesure à la pression) et ont une capacité d'adaptation très rapide aux stimuli. Ils permettent entre autre de sentir l'action d'attraper ou de lâcher un objet, ainsi que sa rugosité de surface.
- Les corpuscules de Ruffini (toniques à champ récepteur étendu) sont responsables de la détection de la pression sur la peau et des contraintes mécaniques telles que l'étirement. Ils sont très présents dans les doigts où ils permettent de contrôler la pression exercée. Il s'agit d'une classe de mécanorécepteurs qui présente une adaptation très faible.
- Les corpuscules de Meissner (phasiques à champ récepteur restreint) qui sont des mécanorécepteurs responsables entre autre du toucher léger. Ce sont des mécanorécepteurs présentant une adaptation très rapide, présents surtout dans la peau glabre.
- Les disques de Merkel (toniques à champ récepteur restreint) sont des récepteurs sensibles à la pression, à la position ainsi qu'à des sensations tactiles statiques telle que la sensation des formes et des bords. Il pourrait, entre autre, s'agir de mécanorécepteurs importants dans la lecture du Braille pour les aveugles.

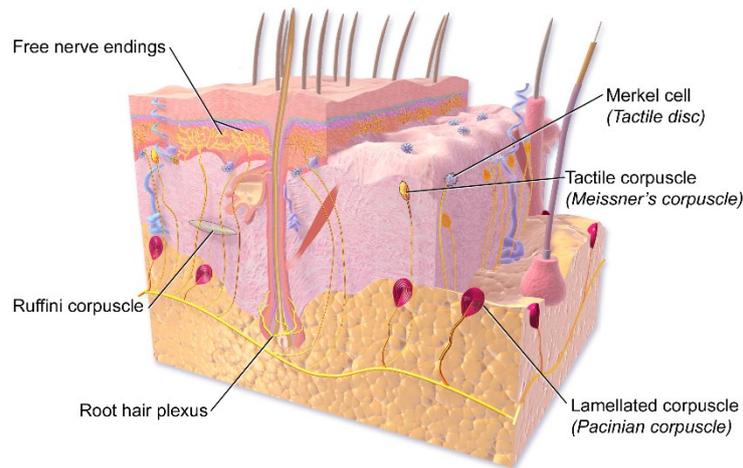


Figure 36. Schéma en coupe de la peau, avec la présence des quatre mécanorécepteurs cités ci-dessus. Sont aussi présent dans la peau des terminaisons nerveuses libres ainsi que des mécanorécepteurs liés aux poils notamment pour les détections des vibrations et des mouvements au niveau de la peau poilue^k

Figure 12.3 Variations among somatic sensory receptors of the skin in receptive field size and adaptation rate. (Source: Adapted from Vallbo and Johansson, 1984.)

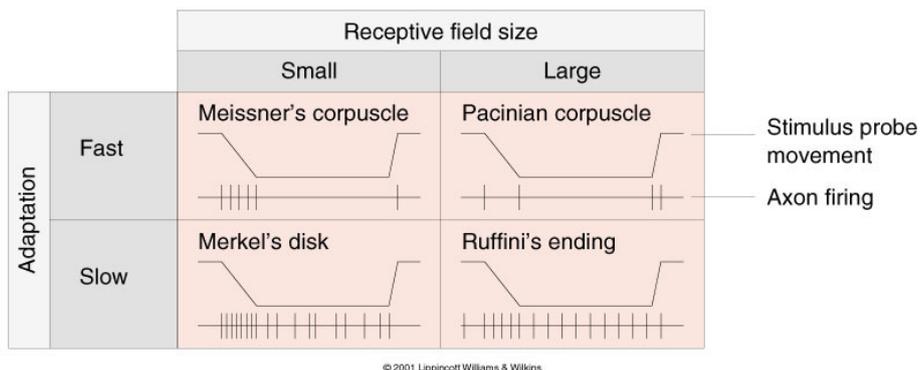


Figure 37. Classement des différents mécanorécepteurs de la peau en fonction de la taille de leur champ réceptif et de la vitesse de leur adaptation.

Les thermorécepteurs

La peau possède aussi des récepteurs à la température, il s'agit des terminaisons nerveuses libres de la Figure 36. Il existe 2 types de thermorécepteurs :

- Les thermorécepteurs au chaud, qui répondent à partir d'une température cutanée d'environ 30°C jusqu'à une température cutanée de 45°C (seuil nociceptif pour le chaud)

^k Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". WikiJournal of Medicine 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436. - Own work

- Les thermorécepteurs au froid, qui répondent à une température cutanée comprise entre 10°C et 35°C. Par ailleurs, certains thermorécepteurs au froid ont aussi une réponse au-delà de 50°C, au-dessus du seuil de douleur.

Tous les organes, à l'exception du système nerveux central possèdent des nocicepteurs dont l'information est apportée au SNC à travers les fibres afférentes primaires (majoritairement des neurones pseudo-unipolaires) jusqu'au lieu de leur intégration primaire : la moelle épinière. Les fibres apportant l'information des nocicepteurs jusqu'au SNC sont les fibres A δ et les fibres C dont nous verrons un peu plus tard être des fibres respectivement peu ou pas myélinisées. Ces neurones sensoriels ont leur soma dans les ganglions de la racine dorsale (GRD ou DRG pour *dorsal root ganglion*, en anglais) avant de projeter leurs axones dans la corne dorsale de la moelle épinière, lieu d'intérêt de cette étude.

2.2.1.2. Les fibres afférentes primaires

Les fibres afférentes primaires sont les fibres neuronales dont les somas des neurones sont situés dans les ganglions de la racine dorsale (et dans les ganglions des nerfs crâniens dans le cas des paires de nerfs crâniens sensitifs (nerfs trijumeaux). À des fins de simplification, dans la suite de ce manuscrit, nous omettrons les nerfs crâniens sensitifs pour nous concentrer seulement sur ceux du système rachidien). Il existe quatre grandes familles de fibres afférentes primaires, en fonction de l'information transportée par celles-ci et de la taille de la gaine de myéline entourant la fibre. Plus la gaine de myéline est de diamètre important, plus la vitesse de conduction de l'information sera grande. Les fibres afférentes primaires sont classées en :

- Fibres A α : Les fibres A α sont celles possédants la gaine de myéline la plus épaisse, et ont un diamètre de l'ordre 10 à 20 micromètres. Responsables de la propagation de l'information proprioceptive ainsi que de l'information venant des muscles squelettiques, les fibres A α ont une vitesse de conduction comprise entre 80 à 120 m.s⁻¹.

- Fibres $A\beta$: Les fibres $A\beta$ sont les fibres responsables de la conduction des informations en provenance des mécanorécepteurs de la peau (corpuscule de Paccini, disques de Merkel, etc.). Ce sont des fibres myélinisées, avec cependant une gaine de myéline plus faible que pour les fibres $A\alpha$, dont le diamètre moyen est de 6 à 12 micromètres et dont la vitesse de conduction est comprise entre 35 et 75 m.s⁻¹.
- Fibres $A\delta$: les fibres $A\delta$ sont les premières fibres responsables du transport de l'information nociceptive ainsi que de l'information liée aux thermorécepteurs. Ce sont des fibres myélinisées, dont le diamètre de la gaine de myéline est encore inférieur aux fibres $A\beta$. Elles possèdent un diamètre de l'ordre de 1 à 5 micromètres et une vitesse de conduction faible, entre 5 et 30 m.s⁻¹.

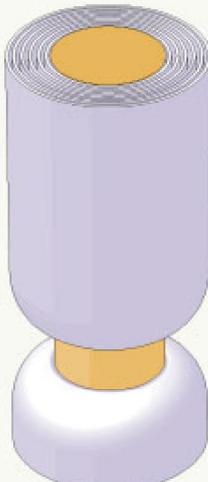
Axons from skin	$A\alpha$	$A\beta$	$A\delta$	C
Axons from muscles	Group I	II	III	IV
				
Diameter (μm)	13 - 20	6 - 12	1 - 5	0,2 - 1,5
Speed (m/sec)	80 - 120	35 - 75	5 - 30	0,5 - 2
Sensory receptors	Proprioceptors of skeletal muscle	Mechanoreceptors of skin	Pain, temperature	Temperature, pain, itch

Figure 38. Classement des fibres afférentes primaires en quatre grandes familles en fonction de leur fonction, de la taille de la gaine de myéline et de la vitesse de conduction, d'après Bear *et al.*, 1996¹⁵.

2.2.1.3. La moelle épinière

La moelle épinière est le premier lieu de l'intégration des informations sensorielles en provenance du système nerveux périphérique. Ces informations rentrent dans la corne dorsale de la moelle épinière, dédiée aux fonctions sensorielles, tandis que la corne ventrale de la moelle est, elle, dédiée aux fonctions motrices et contient les motoneurones. En fonction de la nature de ces informations, et donc de la nature des fibres discutées ci-dessus, les afférences primaires vont rentrer dans des couches différentes de la moelle épinière.

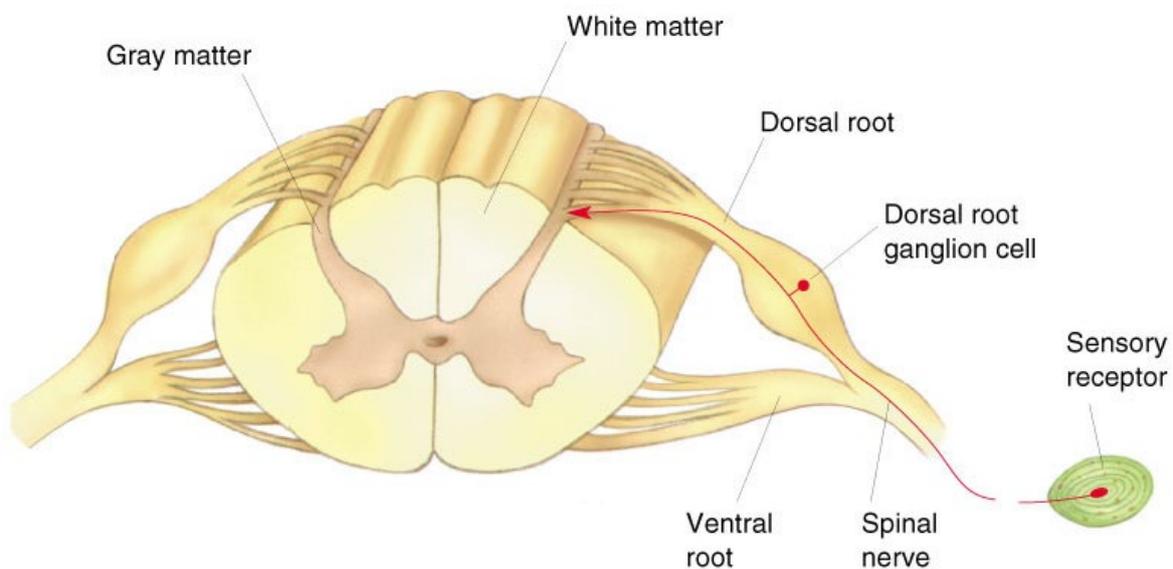


Figure 39. Organisation schématique de la moelle épinière. Les ganglions de la racine dorsale sont les portes d'entrée des fibres afférentes primaires dans la moelle épinière tandis que les motoneurones se trouvent dans la corne ventrale.

Au sein de la moelle épinière, nous observons la présence, comme dans le cerveau, de substance blanche, constituée de longues fibres myélinisées et dépourvue de corps cellulaires, tandis que la substance grise contient les corps cellulaires. Au centre de la moelle épinière, nous observons le canal de l'épendyme qui contient du liquide céphalospinal en écoulement. Les axones en provenance du GRD rentrent directement dans la substance grise et du côté ipsilatéral de la moelle épinière pour former une synapse avec un neurone.

La substance grise dorsale de la moelle épinière, qui contient les neurones jouant le rôle de relais, est séparée en différentes couches, contenant des corps cellulaires activées

préférentiellement par certains types de fibres. Dans le cas des informations non nociceptive, les fibres afférentes forment une synapse dans la couche V qui contient des neurones non-spécifiques, autrement appelés neurones à convergence, pouvant être activés par des stimuli non nociceptifs (mais aussi des stimuli nociceptifs). Notons par ailleurs que l'information tactile en provenance des fibres A α et A β peut aussi directement décussar dans la moelle épinière et former une synapse dans les noyaux des colonnes dorsales par la voie lemniscale.

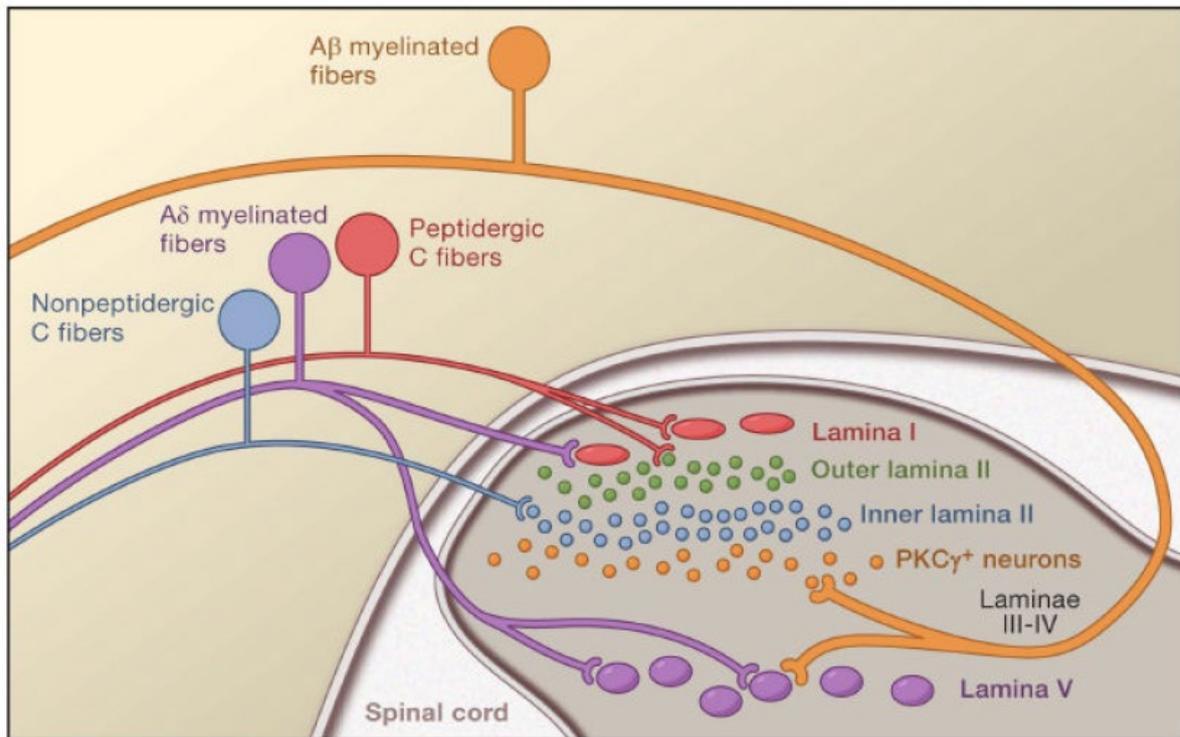


Figure 40. Organisation en couche de la moelle épinière et entrée des afférences primaires. Les neurones nociceptifs A δ et C (respectivement violet et rouge) arrivent dans la couche I et II (et V pour les A δ) et les fibres sensorielles A β projettent dans la couche V des neurones non-spécifiques. D'après Basbaum *et al.*¹⁶

2.2.1.4. La somatotopie

Au sein de la moelle épinière, les afférences primaires suivent un ordre particulier appelé *somatotopie*. La somatotopie permet la discrimination spatiale des sensations. Au niveau du cortex sensoriel, la somatotopie donne le fameux homonculus sensitif, permettant de définir les aires du cortex somatosensoriel activées par une zone précise du corps (Figure 41). De la même manière, la moelle épinière est organisée selon une somatotopie particulière, chaque niveau vertébral innervant une partie bien précise du

corps, comme le montre la Figure 42. Cette organisation permet, en connaissant la zone stimulée, de savoir quelle zone de la moelle épinière va être activée, autorisant une étude somatotopique de la moelle épinière, comme nous le verrons plus tard dans les résultats.

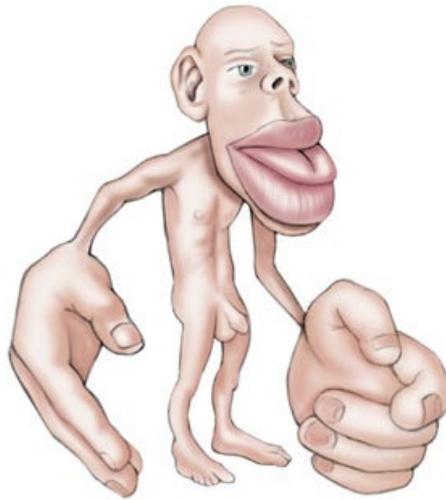


Figure 41. Homonculus somatosensoriel humain, représentant la sensibilité relative de chaque membre du corps humain. Certaines parties du corps sont plus sensibles que d'autres et occupent un espace plus grand du cortex somatosensoriel. En conséquent, ces parties du corps sont plus grandes sur l'homonculus, ici la bouche et les mains.

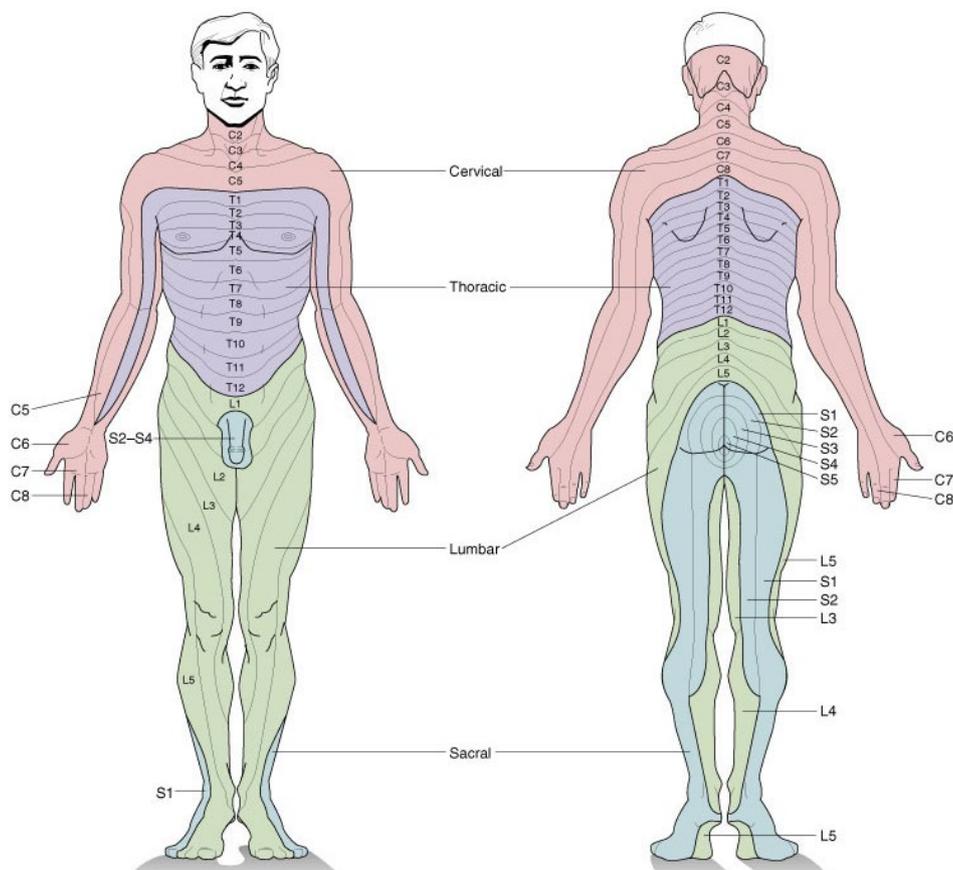


Figure 42. Organisation somatotopique montrée par les dermatomes au niveau de la moelle épinière chez l'homme. On distingue 4 grands niveaux vertébraux : les cervicales, les thoraciques, les lombaires et les sacrées, chaque niveau innervant une partie du corps. Notons que cette organisation somatotopique date d'avant la bipédie chez l'homme, d'où la présence du sexe dans la partie sacrée avec l'arrière des jambes.

2.2.2. La sensibilité nociceptive

Lorsque nous expérimentons un stimulus douloureux avec ou sans effraction de la barrière de la peau, nous expérimentons un message nociceptif, première étape de la douleur. Ce message nociceptif est un message d'alarme du système nerveux périphérique signalant une lésion commence par les nocicepteurs, avant d'être transportés par des fibres spécifiques jusqu'au premier lieu de l'intégration de l'information nociceptive dans la moelle épinière puis jusqu'au cerveau.

2.2.2.1. Les nocicepteurs

Les nocicepteurs (récepteurs au nocif, du latin *nocivus* : 'nuisible, dangereux'¹) sont les récepteurs responsables de la sensibilité douloureuse. Il s'agit de terminaisons nerveuses libres, au même titre que les thermorécepteurs, et indiquent que le corps est en train ou va être endommagé par une rupture de son intégrité.

La douleur, quand elle est aiguë, est un avantage protecteur, il permet de protéger le corps avant un endommagement de son intégrité. Afin d'être sensible à la douleur, le corps possède plusieurs types de nocicepteurs :

- Les mécano-nocicepteurs, répondant à une rupture mécanique de l'intégrité physique, comme un coup tranchant ou contondant.
- Les thermo-nocicepteurs, répondant à une brûlure au-dessus du seuil thermique de douleur (env. 45°C)
- Les chémo-nocicepteurs qui vont répondre à diverses molécules chimiques pouvant induire une rupture de l'intégrité (e.g : venin de serpent, d'abeille, etc.)
- Les nocicepteurs polymodaux répondant à une combinaison des récepteurs ci-dessus

¹ <https://www.dictionnaire-academie.fr/article/A9N0510>

2.2.2.2. Fibres afférentes primaires du transport de l'information nociceptive

Aux fibres afférentes que nous avons déjà décrites en 2.2.1.2, nous ajoutons, comme décrit sur la Figure 38, une nouvelle classe de fibres responsables du transport de l'information nociceptive, il s'agit des fibres C. Les fibres C sont les fibres responsables de la nociception. Ce sont les fibres de plus petit diamètre (de l'ordre de 0,2 à 1,5 micromètres) et elles ont une vitesse de conduction particulièrement lente (0,5 à 2 m.s⁻¹). Les fibres C sont surtout impliquées dans la nociception, mais aussi dans des réactions à la température par exemple.

Notons que deux types de fibres sont responsables de la conduction de l'information liée à la nociception, les fibres A δ et les fibres C. Leur vitesse de conduction étant très différentes (de 5 à 30 m.s⁻¹ pour les premières contre 0,5 à 2 m.s⁻¹ pour les dernières), il existe une bimodalité de la réponse à la douleur. La première est apportée par les fibres A δ et il s'agit de la réponse aiguë à la douleur, tandis que la seconde, apportée par les fibres C est responsable d'une douleur diffuse.

2.2.2.3. Intégration de l'information au niveau de la moelle épinière

Au sein de la moelle épinière, les fibres afférentes A δ et C forment une synapse directement dans les couches I et II de la moelle. Il s'agit de neurones spécifiques à la nociception dans la moelle épinière (Figure 40). Cependant, les fibres afférentes primaires porteuses de l'information nociceptive peuvent également former une synapse sur les neurones à convergence de la couche V, qui se trouvent alors être des neurones non-spécifiques, ceux-ci répondant aussi à une information non nociceptive comme nous l'avons vu en 2.2.1.3.

2.2.2.4. Douleur et cerveau : voies

Une fois le message nerveux passé du système nerveux périphérique au système nerveux central à travers la corne dorsale de la moelle épinière, l'information est transmise au cerveau pour son intégration par les centres supérieurs suivant plusieurs

voies. Ces voies vont correspondre à différents aspects de la douleur, dont une liste non exhaustive est :

- La voie spino-thalamique est la voie principale et est responsable majoritairement de l'aspect sensori-discriminatif de la douleur. Il s'agit d'une voie dont le passage du côté contralatéral se fait directement après la synapse de la corne dorsale et projetant ses axones dans le thalamus latéral avant de projeter à nouveau au niveau, entre autre, du cortex somatosensoriel, responsable du côté sensori-discriminatif de la douleur.
- La voie spino-reticulaire joue un rôle dans la composante affective à la douleur, les axones projetant au niveau du thalamus médian, puis au niveau d'aires impliquées dans la gestion émotionnelle comme le cortex cingulaire, frontal et insulaire. Il joue aussi un rôle dans la modulation descendante de la douleur.
- La voie spino-ponto-amygdalienne, responsable, schématiquement, des aspects limbiques de la douleur. Cette voie joue aussi un rôle dans les contrôles inhibiteurs descendant à la douleur.

Une fois arrivé au cerveau, le message nociceptif est intégré par différentes aires dont le cortex somatosensoriel, le cortex insulaire et le cortex cingulaire antérieur¹⁷, mais notre étude s'est consacrée au niveau lombaire. Cette étude ne s'intéresse pas aux aires corticales mais l'étude de ces dernières sera le fruit de projets futurs au laboratoire.

2.3. Matériel et Méthodes

Modèle animal

Toutes les expérimentations ont été conduites avec l'accord de la directive de l'Union Européenne du 22 Septembre 2010 (010/63/UE) et du comité d'éthique en matière d'expérimentation animale numéro 59, « Paris Centre et Sud », projet 2018-05. A cet effet, le nombre d'animaux dans notre étude a été réduit au strict minimum.

Les expérimentations furent conduites sur 51 rats Sprague-Dawley (Janviers Labs, Le Genest St Isle, France) pesant entre 325 grammes et 350 grammes, arrivés dans l'animalerie une semaine avant l'expérimentation. Les animaux ont été gardés à une

température constante de 22°C, avec un cycle jour-nuit de 12h. L'eau et la nourriture étaient disponibles *ad libitum*.

Coloration In toto de l'architecture vasculaire de la moelle épinière

Après une session d'imagerie fUS, N = 3 rats Sprague-Dawley ont été profondément anesthésiés à l'aide d'une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (150 mg.kg⁻¹). Une fois l'animal sous anesthésie profonde, une thoracotomie a été pratiquée, suivie d'une incision dans l'atrium droit du cœur. Les animaux ont été perfusés avec 2 mL de sérum physiologique (NaCl, 0,9 %) puis avec 15 mL de colorant DiI (1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetraméthylindocarbocyanine perchlorate, à 0,012 mg.mL⁻¹ dans 2% d'éthanol et 98% de tampon phosphate salin (PBS) à 0,02 mol.L⁻¹) comme décrit dans diverses publications¹⁸ puis avec 10mL de para-formaldéhyde à 4% avec un débit de 7mL.min⁻¹. Les moelles épinières ont ensuite été prélevées et fixées pendant 2 jours dans du para-formaldéhyde à 4% et à 4°C avant d'être cryoprotégées dans une solution de sucrose à 30% pendant 2 jours. Les moelles ont ensuite été congelées dans une matrice d'OCT (Milieu optimal de coupe à basse température, *optimal cutting temperature compound*) dans de l'iso-pentane à -40°C refroidit sur glace sèche (CO₂) puis coupées en tranches de 50 µm d'épaisseur en utilisant une méthode dite de « free-floating » dans le PBS et positionnées sur des slides *Superfrost*. Des images en mosaïque ont été immédiatement acquises à l'aide d'un Axio Imager M1 (Zeiss, Jena, Allemagne)

Laminectomie et imagerie fonctionnelle de la moelle épinière

Sous anesthésie profonde (bolus intrapéritonéal de médétomidine (Domitor, 0,4 mg.kg⁻¹) et de kétamine (Imalgène, 40 mg.kg⁻¹), une laminectomie a été réalisée entre la 12^{ème} vertèbre thoracique et la seconde vertèbre lombaire. Cette large fenêtre permet de positionner la totalité de la sonde ultrasonore dans la fenêtre ouverte par chirurgie (14 mm) dans un plan sagittal.

Une fois la laminectomie effectuée, celui-ci est placé dans un cadre stéréotaxique spécifique pour l'étude de la moelle épinière, où le rachis lombaire est suspendu à l'aide de pinces enserrant les vertèbres lombaires. Une application ectopique de lidocaïne (Xylovet, Ceva, France, 2 mg/mL⁻¹) fut réalisée sur les muscles enserrés par la pince ainsi que sur les muscles ouverts par la laminectomie. Au cours d'une séance d'imagerie,

l'anesthésie était maintenue à un niveau réduit par une perfusion sous-cutanée continue de médétomidine ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) et de kétamine ($12,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) en utilisant un pousse-seringue. Afin d'obtenir des résultats reproductibles entre les expérimentations, il était nécessaire d'attendre environ 1h30 après l'injection du premier bolus avant d'obtenir un niveau stable et léger d'anesthésie (avec une fréquence respiratoire d'environ 120 respirations par minute). Pendant la chirurgie et toute la séance d'imagerie, la température corporelle de l'animal était suivie grâce à une sonde intra-rectale et l'animal était maintenu à une température constante de 37°C à l'aide d'un tapis chauffant (Physitemp, Clifton, New-Jersey, USA) et les fréquences cardiaques et respiratoires étaient suivies grâce à un oxymètre infrarouge (MouseOxPlus, Ugo Basile, Italie). Chaque séance d'imagerie a duré entre 4h et 6h.

Pour l'imagerie, deux millilitres de sérum physiologique sont déposés sur la moelle épinière (avec la dure-mère gardée intacte) et la cavité formée par la laminectomie est remplie de gel échographique centrifugé (afin d'éliminer la présence d'air dans le gel échographique). La sonde ultrasonore (15 MHz, Vermon, Tours, France) est placée au-dessus de la cavité à l'aide de moteurs 3 axes (X, Y, Z) sur lesquels est fixée la sonde ultrasonore. La sonde est connectée à un prototype d'échographe fonctionnel (Iconeus, Paris, France et Accélérateur de Recherche Technologique, INSERM).

Stimulations périphériques

Stimulations mécaniques

Dans notre étude, nous avons eu besoin de déterminer le seuil nociceptif mécanique, seuil de la force nécessaire à appliquer sur la patte du rat pour induire une nociception. Ce seuil a été déterminé grâce une séance utilisant une pince calibrée a été effectuée 24h avant la séance d'imagerie en appliquant une force d'intensité croissante sur la patte arrière d'un rat éveillé et habitué à l'expérimentateur¹⁹⁻²¹. Le seuil a été déterminé comme étant de 5N.

Stimulations électriques

Pour pouvoir stimuler différents groupes de fibres (Figure 38), nous avons appliqué différentes intensités en stimulations interdigitales à l'aide d'un générateur de courant²²⁻²⁴ :

- Des stimulations supramaximales des fibres C (nous entendons par là des fibres C, A δ et A β) ont été obtenues pour une intensité de 3 mA.
- Les fibres A δ (et A β) pour une intensité de 1,5 mA.
- Les fibres A β uniquement pour une intensité de 0,5 mA

Pour un récapitulatif complet des fibres stimulées en fonction de l'intensité, se rapporter au tableau ci-dessous (Figure 43).

		Fibres stimulées		
		C	A δ	A β
Intensité de stimulation	3 mA	✓	✓	✓
	1,5 mA	X	✓	✓
	0,5 mA	X	X	✓

Figure 43. Tableau récapitulatif des intensités de stimulation et des groupes de fibres recrutées. La stimulation électrique périphérique des fibres C recrute aussi les fibres A δ et les fibres A β avec une intensité de stimulation de 3mA. La stimulation des fibres A δ recrute, de même, les fibres A β . Enfin, les stimulations électriques périphériques non nociceptives ne recrutent que les fibres A β .

Un générateur basse-fréquence (A310 Accupulser, World Precision Instruments) couplé à un générateur de courant (Digitimer, DS3) est utilisé afin de générer un signal crête (5 secondes, 40Hz) pour effectuer des stimulations électriques sous-cutanées de la patte arrière en utilisant des aiguilles d'acupuncture insérées en interdigital. Afin d'éviter une hypersensibilité de la moelle épinière due à des stimulations répétées des fibres C afférentes²⁵, un maximum de 8 acquisitions (seuil déterminé empiriquement) à 3 mA ont été effectuées par animal.

En ce qui concerne la détermination empirique de la réponse hémodynamique, une stimulation de très forte intensité mais de durée très courte²⁶ (5mA, 2 secondes, 40 Hz)

a été utilisée. Nous avons choisi la durée la plus courte permettant une réponse forte et reproductible entre nos animaux.

Imagerie fonctionnelle ultrasonore : séquence d'imagerie et analyse du signal

Une séquence d'imagerie fUS se déroule de la manière suivante : la moelle épinière est insonifiée par 11 ondes planes ultrasonores successives d'angles variant entre -10° et 10° par pas de 2° avec une fréquence de répétition d'onde de 5,5 kHz. Les échos rétrodiffusés sont ensuite enregistrés sur la même barrette ultrasonore et traités afin de former un bloc de 200 images consécutives à la fréquence de 500 images par seconde (soit 400 ms par bloc de 200 images). Pour isoler le signal provenant des vaisseaux et le signal provenant du tissu, un filtrage par décomposition en valeur singulière (1.4.5.2) est appliqué au bloc de 200 images en retirant les 60 premiers vecteurs singuliers correspondant au signal issu des tissus. Finalement, une image en Doppler de puissance est obtenue toutes les 400 millisecondes par intégration de l'énergie des images Doppler.

Deux plans anatomiques ont été utilisés pour l'imagerie

Deux types de plans ont été utilisés pour les séances d'imagerie : un plan sagittal et plan transverse. Le plan sagittal, bien que n'étant sur un seul plan de latéralité, permet d'avoir un grand champ de vue sur la moelle épinière et un grand nombre de niveaux lombaires imagés en même temps. En revanche, le plan transverse, lui, ne permet d'imager qu'un seul plan en lombaire, mais permet d'observer les activations en ipsilatéral et contralatéral. En ce qui concerne le placement du plan sagittal, un balayage a tout d'abord été effectué de gauche à droite (parallèlement à la moelle épinière, dans le sens médiolatéral) avant de se placer au centre de la moelle épinière par la reconnaissance de structure en 'Y' caractéristiques²⁷. Une fois le centre de la moelle épinière défini, nous nous sommes décalés de 500 μm du côté ipsilatéral à la stimulation. Pour le placement rostro-caudal de la sonde, le centre de la sonde était placé au niveau de renflement lombaire de la moelle épinière.

Pour le positionnement sur le plan transverse, une séquence d'imagerie fonctionnelle préliminaire est effectuée dans le plan sagittal tel que définie ci-dessus. Une fois la carte d'activation fonctionnelle obtenue, la sonde est centrée sur la zone fonctionnellement activée avant d'être tournée de 90° dans le sens antihoraire. Malheureusement, l'imagerie fonctionnelle dans le plan transverse est plus beaucoup

complexe que celle dans le plan sagittal : l'épaisseur limitée de notre plan d'imagerie (400 μm) rend aisé un mauvais placement par rapport à la zone anatomique où l'activation fonctionnelle aura lieu. De plus, les vertèbres et la cage thoracique semblent induire un bruit de fond plus élevé que dans le plan sagittal, rendant l'imagerie dans le sens transverse plus délicate. Ceci explique que la grande majorité de l'étude ait été réalisée dans des plans sagittaux.

Analyse du signal Doppler

Modèle linéaire généralisé (MLG) et analyse fonctionnelle du signal Doppler

Les signaux Doppler sont analysés en utilisant le modèle linéaire généralisé (Generalized Linear Model) implémenté sous Matlab. Dans la matrice d'expérience, la séquence de stimulation a été convoluée avec notre réponse hémodynamique déterminée pour l'imagerie ultrasonore dans la moelle épinière du rat pour les stimulations électriques. Une fois le MLG appliqué, nous obtenons des cartes de Z-score et de p-value. Les cartes d'activation montrées dans la suite de ce manuscrit sont exprimées en Z-score, chaque pixel affiché ayant une p-value $< 0,05$ (avant la correction de Bonferroni).

Notre région d'intérêt est définie comme un carré de 7 pixels par 7 pixels centré sur le maximum du Z-score, et le signal est moyenné dans les deux dimensions spatiales pour n'obtenir qu'un signal temporel. Le signal temporel ainsi obtenu est ensuite exprimé en volume sanguin spinal (VSS, ou SBV pour *Spinal Blood Volume*) en pourcentage en soustrayant et en divisant par la ligne de base du signal (la ligne de base du signal est obtenue pour chaque acquisition en moyennant le signal aux endroits où le signal de stimulation était strictement égal à zéro). Les augmentations de VSS au cours d'un pic de stimulation ont été obtenues en isolant chaque pic de stimulation et en moyennant le signal entre deux temps t_1 et t_2 où t_1 et t_2 sont obtenus en prenant la largeur à mi-hauteur pour le pic considéré.

Analyse statistique des réponses hémodynamiques évoquées

L'analyse statistique des données ultrasonores est réalisée en utilisant un modèle linéaire mixte (LMM en anglais pour *Linear Mixed Model*). Dans le cas de notre étude, le grand nombre d'animaux et la variance inter-individuelle et possiblement intra-individuelle (due aux acquisitions successives pouvant induire une hyperexcitabilité spinale) rendent cette analyse particulièrement intéressante, les données étant non-indépendantes et hiérarchiques (groupe contrôle ou non, animal, acquisition, pic de

stimulation, chaque rang étant inclus dans le rang précédent). De plus, dans un tel modèle, il est possible d'inclure des effets fixes et des effets aléatoires, rendant ce modèle plus flexible. Les effets fixes peuvent être la localisation spatiale du signal choisi (corne dorsale, corne ventrale, etc.) ou l'intensité de la stimulation alors que les effets aléatoires pris en compte sont le numéro de l'animal, le numéro de l'acquisition et du pic.

Afin d'homogénéiser la variance de nos données, celles-ci sont transformées en prenant la racine carrée (qui est une transformation standard pour l'homogénéisation des variances entre les groupes) de leurs valeurs (dans le cas des valeurs négatives, nous prenons le signe de la valeur multiplié par la racine carrée de la valeur absolue) et un test de Bartlett est appliqué pour vérifier l'homogénéité de la variance des données. Le LMM est ensuite appliqué à l'aide de l'algorithme de maximum de vraisemblance en utilisant la fonction *fitlme* de Matlab. La normalité des résidus est testée avec le test de Shapiro-Wilk après l'application du LMM et dans le cas de test entre plus de 2 groupes, les tests *post hoc* ont été effectués à l'aide de l'algorithme *coefTest* de Matlab, en utilisant la correction de Bonferroni pour les tests multiples.

Analyse de la somatotopie des réponses vasculaires médullaires

L'analyse de la somatotopie spinale est réalisée dans le cadre de l'étude par stimulations électriques de la moelle épinière en stimulant différents dermatomes présents sur la patte du rat (L3, L4 et L5) en utilisant le protocole de stimulation comme décrit précédemment (3mA, 40 Hz, 5 secondes). Les cartes d'activation en Z-score ont été obtenues par l'utilisation du MLG, comme décrit précédemment. Du fait de l'étalement de la réponse locale, nous avons dû calculer le barycentre de cette dernière pour pouvoir étudier la somatotopie. Le barycentre des cartes en Z-score a été obtenu en calculant une moyenne pondérée en Z-score des cartes d'activations et nous ne gardons que la composante antéropostérieure dudit barycentre. La mesure est effectuée sur la distance L5-L4 et L5-L3, la composante en L5 ayant été définie comme l'origine utilisée pour notre étude. La position moyenne de L4 et de L3 est calculée en moyennant la totalité des positions obtenues et les lignes de niveaux représentent respectivement le premier, second et troisième quartile du Z-score.

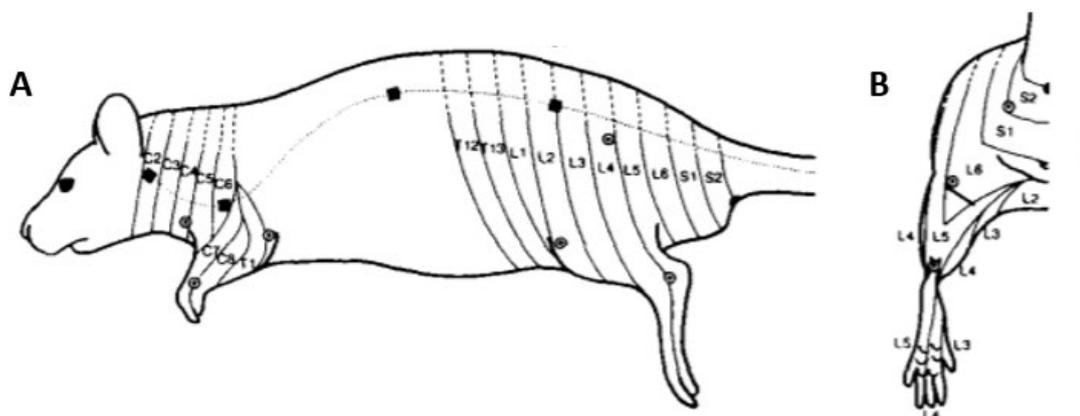


Figure 44. Dermatomes chez le rat. (A) Dermatomes chez le rat dans un axe rostro-caudal. (B) Zoom sur la patte arrière du rat. Les dermatomes présents sur la patte sont les L3, L4 et L5, utilisées dans ce travail sur la somatotopie. Notons que si le dermatome C1 est aligné avec la vertèbre C1, ce n'est pas le cas après, il y a un décalage entre la numérotation du dermatome et la numérotation des vertèbres. Par exemple, au niveau de la vertèbre T12-L2 sont présents les dermatomes L3, L4 et L5

Microscopie de localisation ultrasonore

La microscopie de super-résolution ultrasonore permet, par injection intraveineuse d'agents de contraste, d'augmenter la résolution spatiale (ou ULM pour *Ultrasound Localization Microscopy*) : un cathéter rempli de sérum physiologique est inséré dans la veine jugulaire du rat avant la chirurgie de laminectomie. La méthode de l'ULM, telle que décrite précédemment²⁸⁻³⁰ consiste en l'injection de 150 μL de microbulles (SonoVue, Braco, Italie) dans le cathéter de la veine jugulaire. Deux cents blocs de 600 acquisitions ultrasonores (acquises selon les paramètres suivants : angles -5° , 0° , 5° , à 1000 Hz et un champ d'imagerie de 10 mm) ont été acquis en utilisant la même sonde ultrasonore que dans l'étude ($f_c = 15$ MHz, 128 éléments, Vermon, Tours, France) et le même échographe et logiciel que décrit précédemment.

2.4. Résultats

2.4.1. Anatomie vasculaire de la moelle épinière

Dans la première partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à l'architecture vasculaire de la moelle épinière. Celle-ci a été imagée avec une séquence d'imagerie *fUS*, donnant accès à l'architecture vasculaire *in vivo* de la moelle lombaire chez le rat. Nous avons effectué une image transverse de la moelle épinière, nous permettant d'avoir une image de la veine spinale postérieure (VSP), veine située sur la partie dorsale de la moelle épinière entre la corne dorsale droite et gauche (Figure 45).

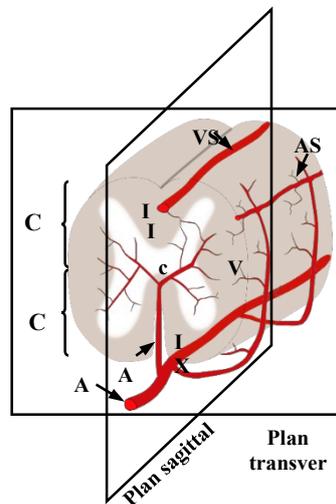


Figure 45. Schéma de l'organisation anatomique de la moelle épinière, la veine spinale postérieure (VSP) est présente sur la corne dorsale de la moelle épinière, tandis que l'artère principale, l'artère spinale antérieure (ASA) est située sous la moelle épinière au niveau de la corne ventrale. Il existe aussi de petites artères courant sur les côtés de la moelle épinière, les artères spinales postérieures (ASP). La moelle épinière est séparée entre 2 cornes, la corne dorsale où arrivent les informations en provenance du système nerveux périphérique, et la corne ventrale où sont situés les motoneurones. Au milieu de la moelle épinière se situe le canal central ou le canal de l'épendyme. CD : Corne dorsale, CV : Corne ventrale, ASA : Artère spinale antérieure, ASC : Artère Sulcale Centrale, VSP : Veine spinale postérieure, ASP : Artère spinale postérieure

De même, l'artère spinale antérieure (ASA) se situe sous la moelle épinière et irrigue la totalité de cette dernière à travers l'artère sulcale centrale (ASC), celle-ci formant plusieurs bifurcations juste avant le canal de l'épendyme pour aller irriguer les cornes dorsales et ventrales du côté gauche et droit.

Il est intéressant de noter que par imagerie fUS de la moelle épinière dans un plan transverse (Figure 46.A), nous n'observons pas la vascularisation dense de la corne dorsale et ventrale comme nous l'observons par imagerie *ex vivo* en microscopie (Figure 46.B) ou même par imagerie ULM (Figure 46.C). La taille des capillaires dans cette zone, de l'ordre de la dizaine de micromètres, est en deçà de la résolution spatiale des ultrasons. L'imagerie ultrasonore (dont la taille des pixels est de 100 μm par 100 μm) et ceux-ci ne peuvent donc pas être visibles sur l'imagerie fUS. Cependant, les capillaires participent au signal Doppler et il est possible d'imager des activations fonctionnelles dans la corne dorsale malgré l'absence apparente de signal (Figure 46.A). De plus, grâce à l'imagerie ULM, nous visualisons un fin réseau vasculaire non visible à l'imagerie fUS à cause du diamètre plus fin des vaisseaux. La détermination de la vitesse des bulles a montré que la vitesse du flux dans ASA est importante, de l'ordre de 15 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, alors que les flux dans la veine spinale postérieure et dans les capillaires du parenchyme de la moelle épinière sont beaucoup plus faibles, de l'ordre, respectivement, de 10 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ et entre 1 à 5 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Après l'imagerie transverse de la moelle épinière, nous nous sommes intéressés à l'imagerie sagittale de celle-ci, avec à nouveau l'imagerie ultrasonore fUS, l'imagerie ULM et la microscopie subséquente à la perfusion au DiI, colorant des parois des vaisseaux sanguins.

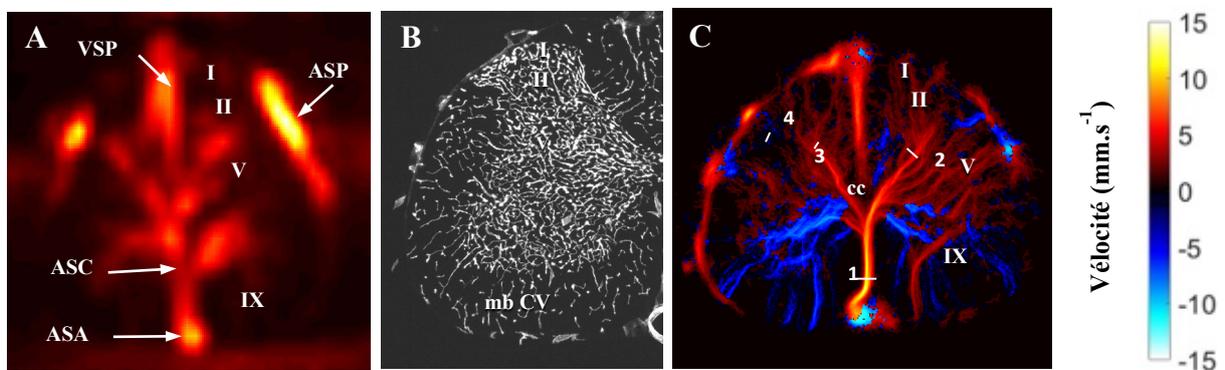


Figure 46. Anatomie vasculaire de la moelle épinière, images d'un plan transverse. A) Image Doppler de la moelle épinière d'un rat. Un signal fort est présent dans la VSP, l'ASA, l'artère sulcale centrale (ASC) ainsi que dans les artères situées sur les côtés de la moelle épinière, les PSA. B) Imagerie par microscopie de fluorescence de la vascularisation de la moelle épinière, on observe une vascularisation dense de la substance grise de la moelle épinière tandis que la substance blanche est moins vascularisée. C) Imagerie par microscopie ultrasonore et étude de la directionnalité du flux d'une coupe transverse de la moelle épinière par injection de microbulles biocompatibles. On observe une vascularisation plus dense dans la corne dorsale que par imagerie fUS (9.A.). VSP : Veine Spinale Postérieure, ASP : artère spinale postérieure, ASC : Artère sulcale centrale, ASA : Artère spinale antérieure, mb : matière blanche, CV : corne ventrale, cc : canal central

Nous n’observons pas non plus, en coupe sagittale, la vascularisation dense de la moelle épinière dans la substance grise de la corne dorsale en imagerie Doppler fUS (Figure 47.A) alors que celle-ci est plus visible en imagerie ULM (Figure 47.B). Cependant, nous observons des structures très échogènes en forme de ‘Y’ correspondant à un vaisseau partant de l’ASA, dont la barre centrale du ‘Y’ est composée par l’artère sulcale centrale (ASC) avant de se dédoubler en deux structures (les branches du ‘Y’) permettant l’irrigation des cornes dorsales gauche et droite de la moelle épinière.

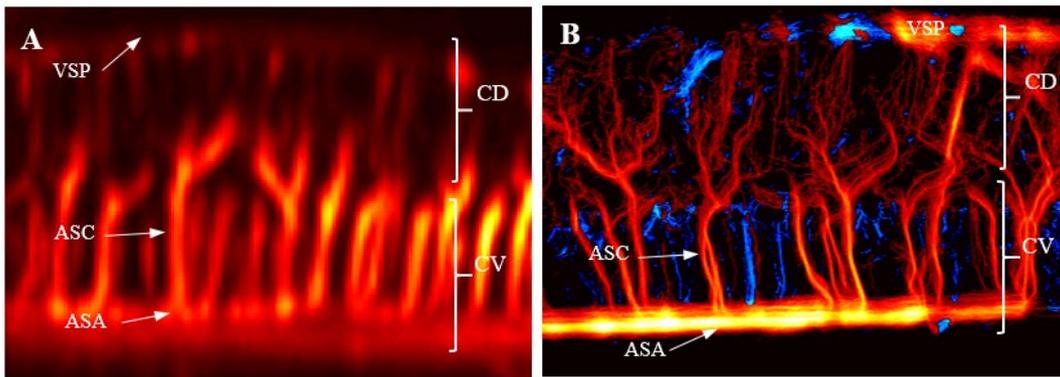


Figure 47. Anatomie vasculaire de la moelle épinière, images réalisées dans un plan sagittal. A) Imagerie Doppler fUS. Nous observons des structures très contrastées en ‘Y’ très contrastées trouvant leurs origines dans l’ASA, se poursuivant par la CSA avant de se séparer en deux branches irrigant la corne dorsale droite et gauche de la moelle épinière (en rouge sur l’imagerie ULM en B). Ces branches se retrouvent aussi dans la partie ventrale de la moelle épinière, irrigant cette fois la partie ventrale de la moelle épinière (en bleu dans l’imagerie ULM). B) Imagerie Doppler ULM en coupe sagittale. Le code couleur est le suivant : en bleu les bulles vont dans le sens contraire à la sonde, en rouge, les bulles vont vers la sonde. VSP : Veine Spinale Postérieure, ASP : artère spinale postérieure, ASC : Artère sulcale centrale, ASA : Artère spinale antérieure, CV : corne ventrale, CD : corne dorsale.



Figure 48. Anatomie vasculaire *ex vivo* de la moelle épinière par coloration *in toto* des vaisseaux sanguins au DiI. Nous observons l’existence des vaisseaux en ‘Y’ que nous observons en imagerie Doppler fUS ainsi que la forte densité de capillaires sanguins présents dans la substance grise de la corne dorsale de la moelle épinière. CD : corne dorsale, CV : corne ventrale.

2.4.2. Activations fonctionnelles de la moelle épinière induites par des stimulations mécaniques naturelles

Pour le second but de cette étude, nous nous sommes intéressés aux réponses neurovasculaires physiologiques de la moelle épinière suite à la stimulation du système nerveux périphérique³¹, pour à la fois des stimulations nociceptives et non nociceptives, induisant, à travers le couplage neurovasculaire³², une réponse hémodynamique locale liée à une réponse neuronale (que nous ne chercherons pas à mesurer par électrophysiologie ici, nombres d'études ayant déjà été réalisées sur l'électrophysiologie de la moelle épinière³³⁻³⁵).

Dans notre cas, nous avons choisi de commencer par des stimulations nociceptives mécaniques et nous nous intéressons aux stimulations naturelles de la patte, comme un pincement plus ou moins fort et douloureux de la patte arrière. Ce type de stimulation présente l'avantage de passer par les récepteurs (voir Figure 37) présents dans les couches de la peau pour générer et transporter le message nociceptif. Nous nous intéressons ici à la réponse hémodynamique induite dans la corne dorsale de la moelle épinière (liée à la sensibilité) lors de telles stimulations.

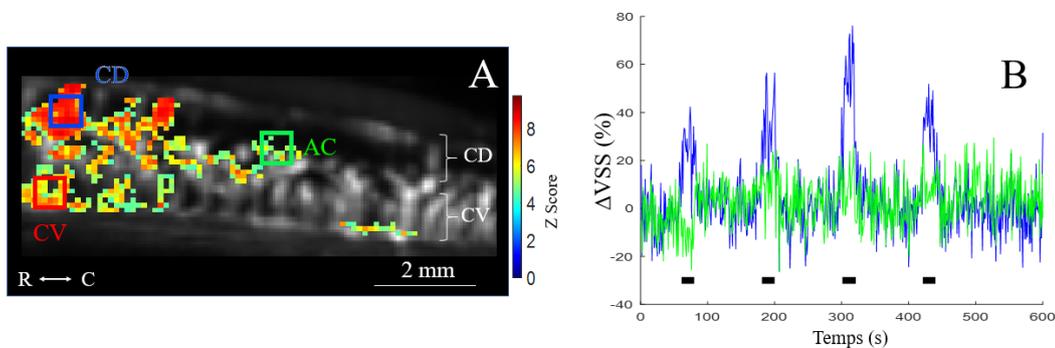


Figure 49. Mise en évidence d'une réponse vasculaire spinale locale lors de l'application de stimuli mécaniques périphériques naturels nociceptifs et non nociceptifs. A) Superposition d'une image anatomique de la moelle épinière et d'une carte en Z-score (pour les pixels ayant $p < 0,05$ (valeur avant la correction de Bonferroni, soit $0,05/(\text{taille de l'image en pixels})$ une fois la correction effectuée) où l'on observe une augmentation du VSS dans la corne dorsale (CD, en bleu) et légère de la corne ventrale (CV, en rouge). Nous avons aussi observé une zone contrôle plus caudale (AC, en vert) située elle aussi dans la corne dorsale. B) Moyenne temporelle de la zone bleue et verte en A). Les traits noirs représentent les stimulations mécaniques par application d'une force nociceptive supérieure à 5 N. CD : corne dorsale, CV : corne ventrale, AC : Aire caudale, VSS : Volume Sanguin Spinal.

Les stimulations mécaniques nociceptives de la patte induisent une réponse hémodynamique caractérisée par une augmentation du VSS dans la corne dorsale de la moelle épinière ainsi qu'une augmentation plus faible dans la corne ventrale. Si on cherche à étudier une zone qui n'est pas censée être activée (ici une zone plus caudale, située 2 mm plus caudal que la zone choisie dans la corne dorsale), nous n'observons aucune réponse hémodynamique évoquée pendant les stimulations (Figure 49.A et Figure 49.B).

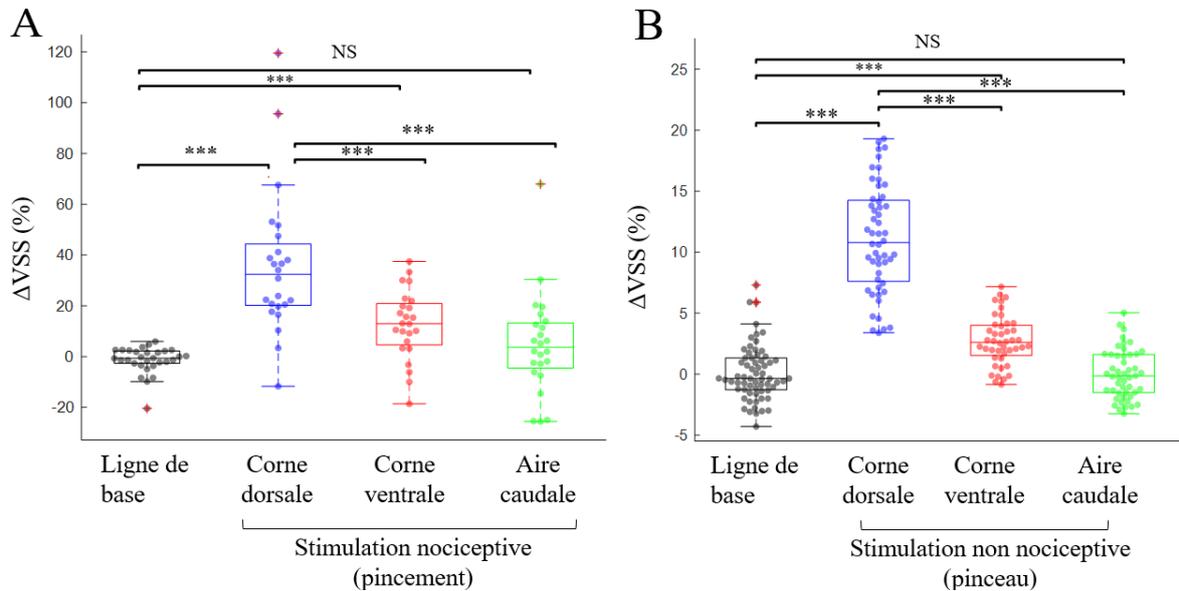


Figure 50. Réponses hémodynamiques évoquées dans la moelle épinière par applications de différents stimuli à la patte arrière. (A-B) Boxplot et valeurs individuelles de la réponse hémodynamique évoquée en volume sanguin spinal (VSS) pour chaque activation, que ce soit pour des stimuli nociceptifs (A) ou non nociceptifs (B). Dans les deux cas, une augmentation importante du VSS est observée dans la corne dorsale de la moelle épinière et légère dans la corne ventrale tandis que l'aire caudale (choisie comme zone contrôle) ne présente aucune activation fonctionnelle. Nombre d'acquisitions pour A) N = 65 points (de 5 rats) pour la ligne de base, N = 52 points (de 5 rats) pour CD, N= 44 points (5 rats) pour CV et N = 48 points (5 rats) pour AC. Nombre d'acquisitions pour B) N = 30 points (4 rats) pour la ligne de base, N = 24 points (4 rats) pour CD, CV et AC. L'analyse statistique est effectuée avec le modèle linéaire mixte (MLM) où la condition est un effet fixe (position spatiale de la réponse hémodynamique (CD, CV, AC)) et le numéro de l'animal et le numéro de l'acquisition et du pic de stimulation sont des effets aléatoires. *** $p < 0,001$, N.S. : non significatif.

Les stimulations des fibres C et A δ induisent une forte augmentation dans la corne dorsale ($35,7 \pm 28,2$ % VSS) et dans la corne ventrale ($12,6 \pm 13,7$ % VSS), statistiquement différente de la ligne de base ($-1,38 \pm 5,19$ % VSS), ayant toutes deux $p < 0,001$. La zone contrôle, plus caudale, est non statistiquement activée ($4,7 \pm 19,8$ % VSS) avec $p > 0,05$ (Figure 50.A). De même, nous avons cherché à caractériser la réponse

à des stimulations mécaniques non-nociceptives telles que le frottement d'un pinceau rêche sur la peau glabre de la patte. Ce genre de stimulation n'active pas les fibres C et A δ comme les stimulations précédentes mais uniquement les fibres A β . Similairement aux données nociceptives, nous observons une réponse neurovasculaire localisée dans la corne dorsale caractérisée par une augmentation du VSS dans la moelle épinière celle-ci étant cependant de plus faible amplitude de lors des stimulations nociceptives ($11,1 \pm 4,41$ % VSS). De même, nous observons une augmentation du VSS dans la corne ventrale ($2,72 \pm 2,02$ % VSS) toujours de plus faible amplitude et une absence de réponse dans la zone la plus caudale de la moelle épinière ($- 0,01 \pm 2,01$ % VSS) par rapport à la ligne de base ($0,09 \pm 2,26$ % VSS), (Figure 50.B). Notre technique présente donc l'avantage d'avoir une forte sensibilité permettant d'observer les réponses hémodynamiques non seulement nociceptives mais aussi tactiles en provenance du système nerveux périphérique. Cependant les stimulations mécaniques ne sont pas précises, et il est difficile de quantifier très précisément la force appliquée sur la patte et les fibres que nous stimulons. Nous nous sommes dirigés vers un autre type de stimulation : les stimulations électriques. Celles-ci présentent l'avantage de pouvoir être parfaitement calibrées et de pouvoir choisir, en fonction des paramètres de stimulation, les groupes de fibres afférentes primaires que nous désirons stimuler.

2.4.3. Stimulation électrique de la moelle épinière

Les stimulations électriques présentent l'avantage, comme nous l'avons dit précédemment, d'être finement calibrées à défaut d'être naturelles. En effet, il est possible de choisir quelles fibres vont être stimulées à l'aide de l'intensité de la stimulation électrique. Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser la réponse hémodynamique du rat en ultrasons, celle-ci n'ayant jamais été établie, puis à caractériser les différentes réponses en fonction des fibres stimulées. Finalement, nous avons aussi pu caractériser l'étendue et la position spatiale de la réponse hémodynamique et de fait la somatotopie.

2.4.3.1. Détermination de la réponse hémodynamique

Pour pouvoir déterminer avec précision les réponses hémodynamiques évoquées par des stimulations électriques, qui sont de très courtes durées, il est nécessaire d'avoir accès à une fonction de transfert pour pouvoir se rapprocher le plus de la réponse obtenue

dans la moelle épinière. La fonction de transfert, ou réponse à un « dirac » est dans notre cas la fonction de réponse hémodynamique. La détermination de la réponse hémodynamique a été effectuée avec la plus courte stimulation supramaximale possible qui produit une réponse évoquée dans la moelle épinière (5mA, 40 Hz, 2 secondes). Cinq acquisitions sur 2 rats (soit un total de 10 acquisitions) ont été effectuées afin de servir à la détermination de la réponse hémodynamique.

Une fois les données acquises, une fonction gamma inverse a été appliquée (*lsqcurvefit*, Optimization Toolbox, Matlab) sur chacune des acquisitions avant le moyennage des valeurs pour obtenir la réponse hémodynamique moyenne.

Compte-tenu de la littérature sur la HRF^{36,37}, nous obtenons l'expression suivante pour la réponse hémodynamique de la moelle épinière :

$$HRF : t \rightarrow A \cdot \frac{\beta^\alpha}{\Gamma(\alpha)} \cdot t^{-(\alpha+1)} \cdot \exp\left(\frac{-\beta}{t}\right)$$

Eq 1. Equation de la réponse hémodynamique de la moelle épinière du rat pour l'imagerie ultrasonore.

où $A = 6,1 \pm 1,8$; $\alpha = 2,5 \pm 1,3$ et $\beta = 12,7 \pm 7,0$. Γ représente la fonction gamma d'Euler.

Le seuil de détectabilité (seuil correspondant au volume sanguin spinal dépassant deux fois l'amplitude de la déviation standard de la ligne de base) est franchi après $1,4 \pm 0,2$ secondes après la stimulation, à 14 ± 4 % d'augmentation du volume sanguin spinal. La réponse hémodynamique atteint son maximum à $3,0 \pm 0,9$ secondes après la stimulation. Il est intéressant de noter que cette fonction de transfert est très similaire à celle décrite dans le bulbe olfactif³⁸ par d'autres équipes ou même à celle déterminée dans le cerveau de rats anesthésiés ($2,0 \pm 0,3$ de détectabilité, $5,0 \pm 0,7$ secondes de maximum³⁹) ou encore chez le primate non-humain éveillé ($1,4 \pm 0,6$ secondes pour la détectabilité, 2,5 secondes pour le maximum⁴⁰). Notre réponse hémodynamique, contrairement à celle de l'IRM, ne possède pas de *dips* initial ni à la fin de la réponse hémodynamique. L'absence de ce *dips* initial et final est dû à la nature de la mesure : nous mesurons directement le volume sanguin et non pas le rapport $[HbO]/[Hb]$, ce qui explique l'absence de cette partie négative du signal. Nous n'observons jamais d'hypoperfusion précédant ou suivant une activation fonctionnelle.

2.4.3.2. Réponse hémodynamique induites par stimulation électrique

Les stimulations électriques présentent l'avantage de pouvoir être finement calibrées et de pouvoir permettre une sélectivité des fibres stimulées (voir Figure 43), c'est pour cela que nous nous sommes intéressés aux stimulations électriques du système nerveux périphériques dans le cadre de notre étude de la moelle épinière.

Une fois que la fonction de réponse hémodynamique a été déterminée, celle-ci fut utilisée pour l'étude des stimulations électriques périphériques : ces dernières étant de très courtes durées (5 secondes), nous avons convolué le signal théorique avec la réponse hémodynamique déterminée expérimentalement. Afin d'évaluer les réponses évoquées par la stimulation des différentes fibres afférentes, nous avons stimulé les différents groupes de fibres tel que décrit dans la littérature²²⁻²⁴ ; il est important de noter que lorsque l'intensité de stimulation augmente, toutes les fibres ayant un seuil de stimulation plus faible sont également stimulées (Figure 43). A cet effet, les fibres A β sont également stimulées lorsque les fibres A δ et/ou les fibres C sont stimulées.

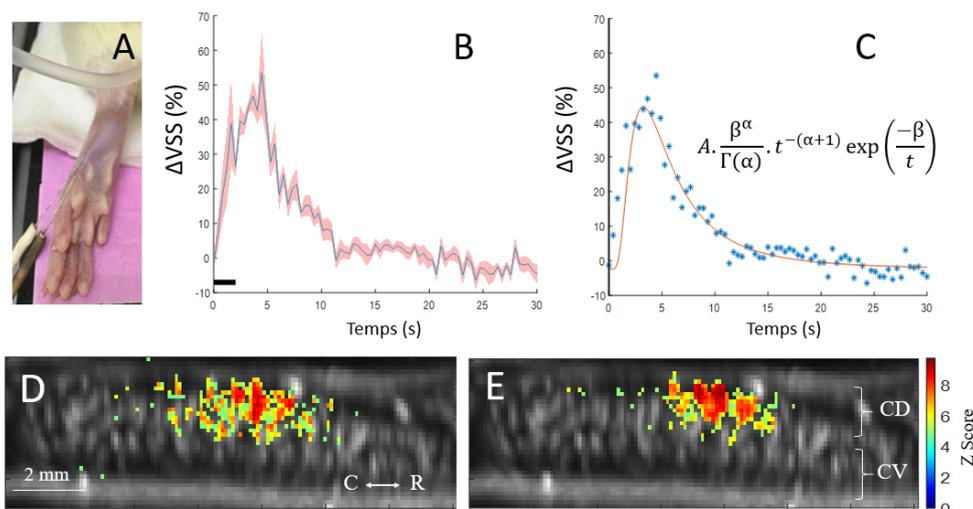


Figure 51. Détermination de la réponse hémodynamique spinale type à l'aide des ultrasons fonctionnels. A) Image illustrant l'implantation des aiguilles d'acupuncture servant d'électrodes pour la stimulation. B) changement hémodynamique moyen (bleu) et écart standard à la moyenne (rouge) du volume sanguin spinal après une stimulation nociceptive du système nerveux périphérique. La ligne noire indique le temps de stimulation. C) Détermination analytique de la réponse hémodynamique grâce au fit d'une fonction gamma-inverse. Les points expérimentaux sont représentés par des étoiles bleues et le fit est représenté par la ligne rouge. D)E) Exemple de cartes d'activations en Z-score ($p < 0,05$ avant correction de Bonferroni) avec (E) et sans (D) la réponse hémodynamique déterminée en C). On remarque que l'utilisation de la réponse hémodynamique précise la réponse, tant spatialement que quantitativement. VSS : volume sanguin spinal, C : caudal, R : Rostral, CD : Corne dorsale, CV : corne ventrale.

Les stimulations électriques des fibres A β (0,5 mA) ne semblent pas induire de réponse hémodynamique ($-0,4 \pm 6,0\% \Delta VSS$) par rapport à la ligne de base ($0,5 \pm 0,7\% \Delta VSS$, $p > 0,05$) tandis que les stimulations des fibres A δ (1,5 mA) et C (3 mA) induisent une augmentation statistiquement significative (A δ : $35,4 \pm 5,1\% \Delta VSS$ $p < 0,001$; C : $73,4 \pm 7,5\% \Delta VSS$, $p < 0,001$). L'amplitude de la réponse induite par les fibres C est plus grande que l'amplitude de la réponse pour les fibres A δ , suggérant que les fibres C jouent un rôle important dans la réponse vasculaire induite par des stimulations périphériques, lorsque celle-ci sont stimulées. (Figure 52.A-C).

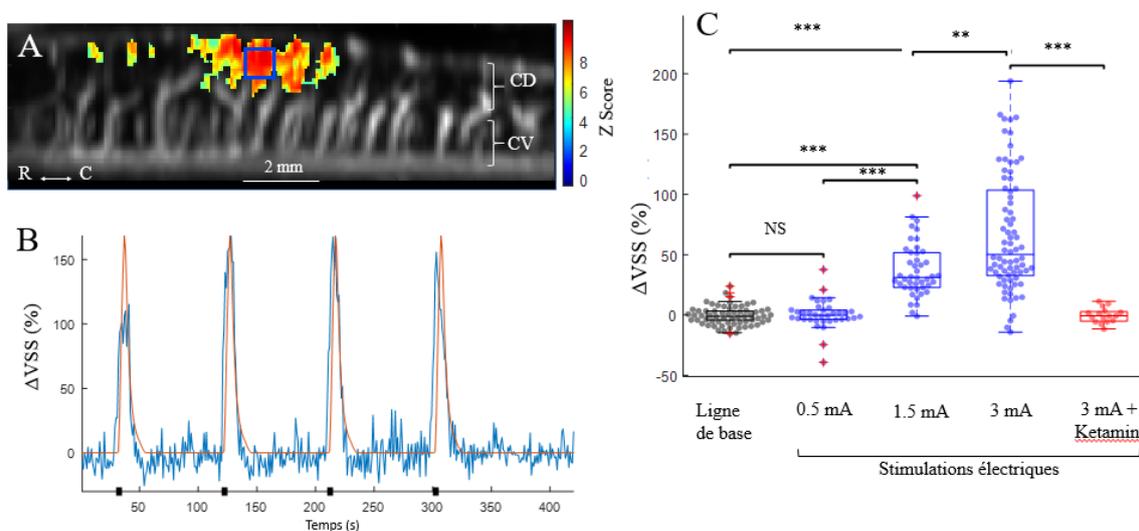


Figure 52. La réponse hémodynamique évoquée dans la moelle épinière par stimulation des fibres afférentes est fibre spécifique. A) Exemple typique d'une activation fonctionnelle dans la corne dorsale d'un rat par stimulation électrique des fibres C. La carte d'activation a été obtenue grâce au modèle linéaire généralisé et à la réponse hémodynamique déterminée précédemment. L'activation est spatialement très délimitée à la corne dorsale de la moelle épinière au niveau du renflement lombaire. B) Signal temporel moyen en augmentation relative par rapport à la ligne de base du volume sanguin spinal dans la zone définie en bleu en A). Le signal bleu est le signal expérimental moyen, le rouge le signal « théorique » obtenu en convoluant le peigne de stimulation avec la HRF déterminée expérimentalement. Les points noirs représentent les stimulations électriques. C) Analyse statistique de la comparaison entre les différentes intensités de stimulations. La réponse des fibres C est bloquée par l'application ectopique de kétamine sur la moelle épinière, suggérant que le glutamate et le récepteur NMDA est une composante essentielle du couplage neurovasculaire. CD : corne dorsale, CV : corne ventrale, R : rostral, C : caudal, VSS : volume sanguin spinal, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, N.S. : non significatif

Nous nous sommes ensuite demandé si, les fibres C utilisant le neurotransmetteur glutamate, un blocage sélectif des récepteurs NMDA situés dans la corne dorsale de la moelle épinière induirait une diminution de la réponse hémodynamique évoquée. Par application ectopique de kétamine diluée sur la moelle épinière, nous avons complètement bloqué la réponse hémodynamique induite par la stimulation des fibres C ($-0,4 \pm 1,5\% \Delta VSS$, $p > 0,05$ par rapport à la ligne de base). Par ces résultats, nous suggérons que (1) : la réponse hémodynamique évoquée dans la moelle épinière est fibre dépendante et que (2) la réponse hémodynamique est un mécanisme NMDA-dépendant (dont la kétamine est un antagoniste) et le glutamate en tant que neurotransmetteur.

Nous nous sommes ensuite penché sur l'étude spatiale de la réponse vasculaire, en effet les fibres afférentes primaires rentrent dans la moelle épinière du côté ipsilatéral, de fait, imager la moelle épinière dans un plan transversal devrait donner des informations capitales quant à la localisation spatiale de la réponse, notamment sur l'étendue spatiale ipsilatérale et la présence (ou l'absence) d'une réponse du côté contralatéral.

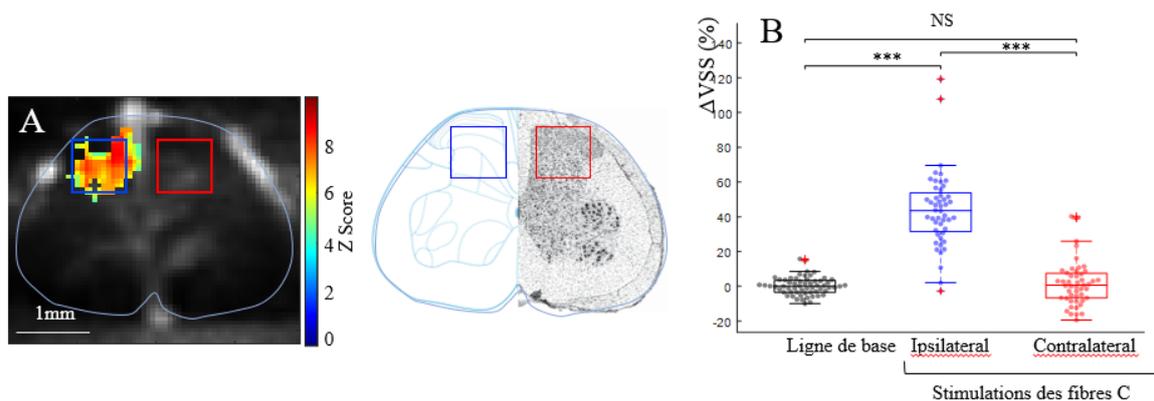


Figure 53. Imagerie fonctionnelle ultrasonore dans un plan transversal. A) exemple d'une séance d'imagerie ultrasonore avec une réponse vasculaire induite dans la corne dorsale ipsilatérale à la stimulation. La barre d'échelle en A) s'applique pour les 2 panneaux de A). B) Analyse statistique pour la comparaison entre la ligne de base (noir) les réponses évoquées du côté ipsilatéral (bleu) et du côté contralatéral (rouge). Les activations fonctionnelles sont restreintes au côté ipsilatéral ($44,0 \pm 3,1\% \Delta VSS$) par rapport à la ligne de base ($0,2 \pm 0,7\% \Delta VSS$, $p < 0,001$) ainsi que par rapport au côté contralatéral ($1,4 \pm 1,8\% \Delta VSS$, $p < 0,001$). *** $p < 0,001$. NS : non significatif. Chaque point représente les activations individuelles et les statistiques sont obtenues à l'aide du modèle linéaire mixte, avec les mêmes effets fixes et aléatoires que pour les panels précédents.

Comme nous le montrons sur la Figure 53.A, nous observons une réponse fortement localisée dans la corne dorsale de la moelle épinière et plus particulièrement dans la substance grise de la corne dorsale : les activations fonctionnelles sont restreintes au côté ipsilatéral et le côté contralatéral ne présente pas de réponse évoquée (voir Figure 53.B). La taille spatialement limitée de la réponse hémodynamique (de l'ordre de 1 mm) correspond environ à la zone neuronale activée dans la corne dorsale, suggérant que l'imagerie fUS mesure avec précision l'augmentation locale du flux hémodynamique induit par une activation neuronale.

2.4.3.3. Analyse de la somatotopie des réponses neurovasculaires médullaires par imagerie fonctionnelle ultrasonore

Au-delà de la localisation de la réponse dans un plan transverse, les entrées des fibres afférentes primaires dans la moelle épinière suivent, comme au niveau du cortex somatosensoriel, une organisation somatotopique⁴¹⁻⁴³. Une stimulation d'un dermatome particulier de la patte du rat active les neurones nociceptifs spécifiques (ou non spécifiques) du niveau spinal correspondant. Malgré ces études par électrophysiologie ou encore par marquage cellulaire, l'imagerie *in vivo* n'a pas été capable, à ce jour, de mesurer la somatotopie à cause d'une mauvaise résolution spatiale et d'une mauvaise sensibilité. Les ultrasons fonctionnels ayant l'avantage de coupler une bonne résolution spatiotemporelle (100 μm x 100 μm de résolution spatiale) avec un large champ de vue (~14mm avec la sonde que nous utilisons) et une bonne sensibilité, grâce à la stimulation électrique des fibres C nociceptives, nous sommes capables de visualiser, *in vivo*, la somatotopie et le décalage spatial induit par le changement de dermatome stimulé.

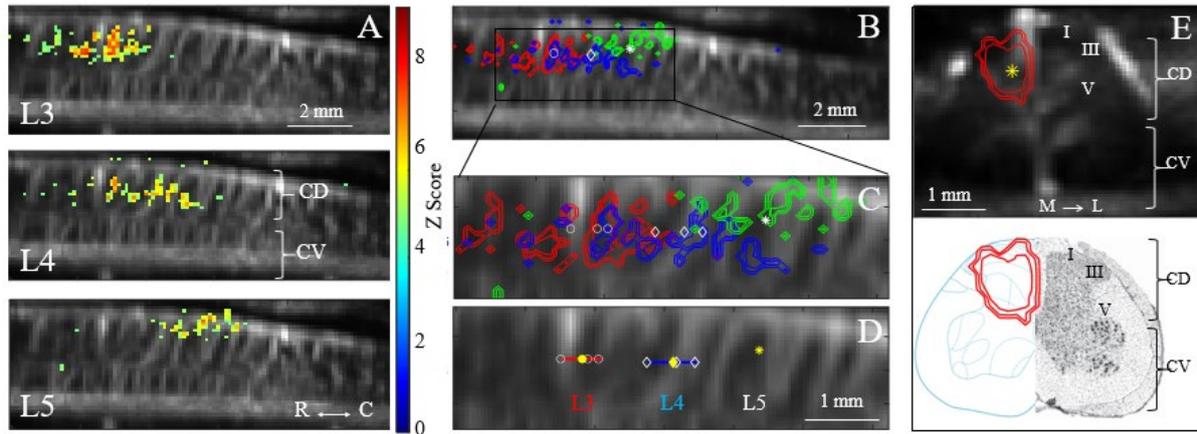


Figure 54. Les réponses hémodynamiques évoquées de la moelle épinière reflètent la somatotopie des fibres afférentes primaires. A) Exemple sur un animal du décalage spatial de la zone fonctionnellement activée de la corne dorsale de la moelle épinière (carte d'activation en z-score obtenue avec le modèle linéaire généralisé) par une stimulation nociceptive des fibres C dans les dermatomes L3,L4 et L5 de la patte arrière. (B-E) Quantification des zones spatiales fonctionnellement activées (sur plusieurs animaux) grâce au barycentre pondéré de chacune des cartes d'activations dans le plan sagittal (B-D) et dans le plan transversal (E). (B-D) Code couleur des différents dermatomes : L3 = rouge, L4 = bleu, L5 = vert. Les courbes bleue, rouge et verte représentent les lignes de niveaux correspondant respectivement au premier, second et troisième quartile. (C-D) la position en L5 (étoile) est utilisée comme invariant pour le calcul de la position de L4 (diamant) et de L3 (cercle) entre les différents animaux. Seule la position horizontale est prise en compte. La position verticale est ignorée pour cette étude. (D) Le diamant jaune et le cercle jaune représentent respectivement la position moyenne à travers les $N = 3$ animaux pour L4 et $N = 3$ animaux pour L3 de la position relative de L3 et L4 par rapport à L5. La barre d'échelle de (D) s'applique en (D) et en (C). (E) : De même que pour (B) mais dans un plan d'imagerie transverse ($N = 1$ animal sur 6 acquisitions). A cause de la variabilité inter-individuelle et de l'absence de point repère, il est impossible de moyenniser plusieurs animaux pour le plan transverse. Le panel du bas permet de localiser la réponse hémodynamique induite dans les laminations I à V de la moelle épinière. CD : Corne dorsale, CV : Corne ventrale, M-L : Medio-Lateral, R-C : Rostro-Caudal.

Comme montré dans la Figure 54.A, les cartes d'activations présentent un décalage spatial lorsque le dermatome stimulé électriquement change : la zone est de plus en plus caudale au fur et à mesure que l'on passe de L3 à L4 puis à L5. Nous avons quantifié ce phénomène sur plusieurs animaux en calculant le barycentre pondéré de chaque carte d'activation pour chaque dermatome, en prenant la valeur obtenue pour L5 comme origine, et en calculant la distance horizontale $LX-L5$. La composante verticale est ignorée dans cette étude. L'analyse spatiale montre un décalage spatial de l'ordre de $1,2 \pm 0,4$ mm pour la distance L4-L5 et de $2,5 \pm 0,3$ mm pour la distance L5-L3 (Figure 54 B-D).

En imageant la moelle dans un plan transverse, l'analyse montre que les aires fonctionnellement activées sont limitées aux couches I-II et IV-V de la moelle épinière, localisation respectives des neurones nociceptifs spécifiques et des neurones non-spécifiques (Figure 40 et Figure 54.E)

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés à la moelle épinière dans un état physiologique. On peut se demander si, dans un état pathologique induit, par exemple par une inflammation locale, il existe une modification de la réponse spinale.

2.4.4. Imagerie d'une allodynie inflammatoire induite

L'allodynie est une sensation douloureuse anormale caractérisée par l'application d'un stimulus normalement non douloureux. Il s'agit très probablement de l'un des symptômes cliniques les plus présents pour les maladies chroniques douloureuses. Les fibres afférentes primaires conduisant l'information douloureuse et l'information tactiles sont proches, et un consensus se dégage sur le fait que l'allodynie pourrait être due à une réorganisation fonctionnelle des circuits de la moelle épinière^{33,44}. Durant une inflammation périphérique, à cause de l'activation tonique des fibres afférentes primaires. Une hyperexcitabilité médullaire se met en place, en effet les neurones de cette dernière se retrouvent dans un état de réponse facilitée, amplifiée ou potentialisée³³. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés réponses neurovasculaires altérées dans un domaine d'allodynie inflammatoire, et plus particulièrement aux mécanismes neurovasculaires. Sur $N = 14$ rats, séparés en 2 groupes et recevant 24h avant une injection unilatérale de 50 μ L de solution saline pour le groupe contrôle ou de 50 μ L d'adjuvant de Freund Complet (CFA) dans la patte arrière gauche, nous quantifions l'allodynie mécanique inflammatoire à court terme induite par l'inflammation due au CFA en imageant la réponse vasculaire induite par une stimulation des mécanorécepteurs cutanés de la peau glabre de la patte arrière (à l'aide d'un pinceau rêche, voir 2.4.2) tel que décrit dans la Figure 55.A. Nous observons une réponse exacerbée dans le groupe CFA (Figure 55.B-C) par rapport à un groupe contrôle (Figure 55.D, $p < 0,001$). Nous observons cependant aussi un effet fort de l'animal, suggérant que certains animaux ont pu plus ou moins réagir à l'injection de CFA. Tous les résultats statistiques sont retrouvables dans les tableaux en annexe.

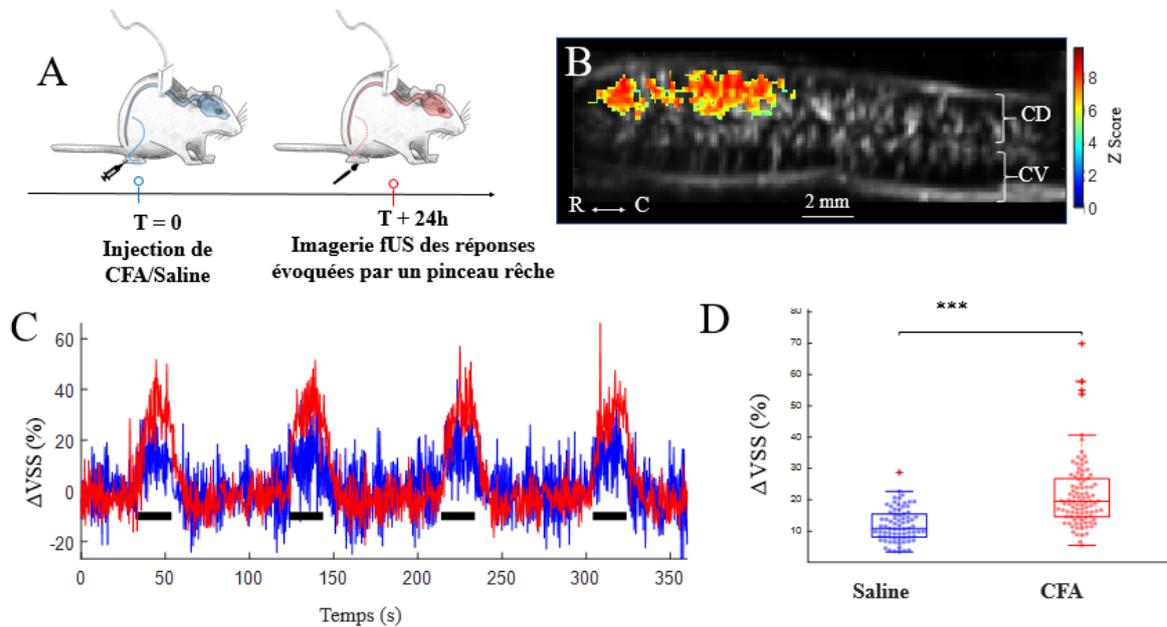


Figure 55. La stimulation mécanique allodymique de la patte inflammée induit une réponse vasculaire médullaire plus intense par rapport au groupe contrôle. A) Design expérimental. A T = 0, les animaux reçoivent une injection unilatérale de saline (groupe contrôle) ou d'adjuvant de Freund Complet (CFA, groupe inflammé) dans une patte arrière. Les réponses évoquées sont étudiées 24h après l'injection. B) Exemple sur un animal, inflammé de la carte d'activation fonctionnelle (en Z-score), comme décrit précédemment. C) Signal temporel moyen pour le groupe contrôle (bleu, N = 7 rats) et pour le groupe inflammé (rouge, N = 7 rats) dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les traits noirs indiquent stimulations de la patte injectée. D) Boxplot général de comparaison entre le groupe saline et le groupe CFA. Chaque point représente une stimulation (N = 76 pour le groupe contrôle, N = 96 pour le groupe CFA). Le modèle linéaire mixte montre une différence significative entre les deux groupes, mais aussi un effet de l'animal, indiquant que certains animaux ont pu plus ou moins réagir à l'injection de CFA. CD : corne dorsale, CV : corne ventrale, R : rostral, C : caudal, VSS : Volume sanguin spinal, CFA : Adjuvant de Freund Complet

2.5. Discussion et conclusion

L'imagerie fonctionnelle ultrasonore permet d'imager les activations fonctionnelles⁴⁵⁻⁴⁷ du système nerveux central, mais aussi la connectivité fonctionnelle^{47,48}. Les avantages des ultrasons fonctionnels, par rapport à d'autres modalités d'imagerie comme l'IRM sont leur sensibilité et leur résolution spatiotemporelle, excellente par rapport à un imageur IRM. Cependant, nous étudions, à l'aide des ultrasons fonctionnels, un phénomène lent : le couplage neurovasculaire. Nous sommes donc limités, de façon inhérente, par les processus physiologiques mis en jeu dans notre étude, ce qui limite la

résolution temporelle effective malgré la très grande cadence d'imagerie. Cependant, grâce aux ultrasons fonctionnels, il est possible d'étudier la propagation du signal à l'aide de la fréquence d'imagerie ultrarapide (< 10 ms par image), notamment dans le cerveau du primate non-humain éveillé⁴⁰. De même, la résolution spatiale effective peut être au niveau du pixel ou d'un groupe de pixels, bien en-deçà de la taille du blob de la réponse hémodynamique, comme montré dans le cortex auditif du furet⁴⁵ ou encore dans le cortex visuel du primate non-humain⁴⁹.

Les avantages des ultrasons fonctionnels sont la très bonne résolution spatiale, temporelle et surtout sa portabilité et son prix, qui le rendent très concurrentiel face à l'IRM. Cependant, les ultrasons fonctionnels présentent le désavantage de n'imager que dans un plan 2D (avec quelques développements récents quant à l'imagerie 3D, avec des sondes matricielles⁵⁰ et des sondes adressées en lignes colonnes⁵¹) et de ne pas passer à travers les os, ce qui, à part dans certains cas comme chez la souris ou le jeune rat⁵², chez le jeune enfant à travers la fontanelle⁵³, ou en imagerie peropératoire au bloc⁵⁴, nécessite, comme dans cette étude, une opération chirurgicale pour retirer l'os.

2.5.1. Activations fonctionnelles dans la moelle épinière du rat

Les stimulations du système nerveux périphérique induisent, dans la moelle épinière, une augmentation de l'activité neuronale⁵⁵, une augmentation de la consommation d'énergie⁵⁶, une augmentation de l'activité métabolique⁵⁷ et un signal BOLD détectable en IRM¹. A l'aide de l'imagerie ultrasonore, nous montrons qu'à la suite d'activation des fibres C, ce que soit par des stimulations mécaniques naturelle ou par des stimulations électriques des fibres C, une réponse évoquée située du côté ipsilatéral de la corne dorsale et étalée sur environ 1 à 2 mm. La localisation de cette réponse dans la corne dorsale ipsilatérale est cohérente avec d'autres études en imagerie IRM²⁻⁴, en imagerie optique intrinsèque⁵⁸ ou en imagerie optique de diffusion³¹ et suggère que la réponse est très fortement limitée spatialement au côté ipsilatéral et aux laminations correspondantes aux couches où se situent les neurones nociceptifs spécifiques. Cependant, certaines études, notamment chez l'homme en IRM, montrent l'existence d'une réponse contralatérale, pour des stimuli thermiques^{11,14,59,60} mais cette réponse n'a pas toujours été observée pour ce genre de stimulation⁶¹ et n'a jamais été observée chez le rongeur. De plus, nos animaux sont anesthésiés, au contraire des études chez l'homme où celui-ci est vigile, ce qui pourrait expliquer les différences de résultats. Les stimulations interdigitales sont connues pour activer différents dermatomes de la patte jusqu'à la moelle épinière où elles activent les neurones post-synaptiques^{62,63}.

L'étude de la somatotopie à travers la réponse hémodynamique a déjà été effectuée chez l'homme, en IRM^{9,11,13,14,61}, mais, à notre connaissance, n'a jamais été effectuée chez le rongeur. Malgré l'étendue spatiale de la réponse hémodynamique, nous avons été capable d'étudier, pour la première fois, la somatotopie chez le rat avec la stimulation des dermatomes L3, L4 et L5. Le décalage spatial des réponses hémodynamiques évoquées est consistant (L4-L5 : $1,2 \pm 0,4$ mm, L3-L5 : $2,5 \pm 0,3$ mm) avec la neuroanatomie connue de la moelle épinière^{42,62}. Il est intéressant de noter que la réponse hémodynamique évoquée, observable sur les cartes d'activations, est spatialement hétérogène. Elle consiste le plus souvent en 2 ou 3 parties ovales discontinues d'environ 700 μm de diamètre, disposée dans l'axe antéropostérieur. On peut supposer que cette hétérogénéité peut être liée à soit une discontinuité de la distribution des fibres afférentes primaires, soit à une hétérogénéité dans le diamètre des vaisseaux sanguins irrigant la corne dorsale.

Cependant, la littérature décrit en détail que la présence des neurones post-synaptiques (nociceptif spécifique, dans les couches I et II, ou nociceptif non-spécifique dans les couches profondes V) est homogène dans la moelle épinière. A cet effet, l'hétérogénéité spatiale de la réponse hémodynamique est très probablement d'origine vasculaire.

Nous avons également montré que les fibres A δ et les fibres C induisent une réponse évoquée robuste dans la moelle épinière à travers un mécanisme impliquant les récepteurs NMDA. Ce n'est pas la première fois qu'une étude pharmacologique est effectuée par imagerie de la moelle épinière⁷, mais cela montre qu'une variété d'études pharmacologiques sont possible sur la moelle. Au-delà des stimulations nociceptives, les ultrasons fonctionnels sont aussi capables d'imager les réponses évoquées par des stimulations tactiles non nociceptives. De telles stimulations ont déjà été imagées chez l'homme, mesurées par IRM^{9,12-14,59,61}, mais jamais chez le petit animal, même avec injection de produits de contraste IRM comme les USPIO (*UltraSmall SuperParamagnetic Iron Oxide particles*). Une étude a réussi à détecter, par imagerie optique de diffusion³¹, les stimulations tactiles chez le rat de laboratoire, mais cette technique présente le désavantage de ne pas présenter une bonne discrimination spatiale.

2.5.2. Activation fonctionnelle pathologique dans la moelle épinière

Enfin, nous nous sommes intéressés à un phénomène d'inflammation périphérique induisant un état pathologique chez nos animaux. La douleur persistante, associée à une maladie ou à une blessure, peut conduire à un phénomène de sensibilisation

centrale et périphérique. La sensibilité centrale de la moelle épinière est caractérisée par un état d'hyperexcitabilité du système nerveux central, ou un stimuli normalement non-nociceptif, comme une caresse par un pinceau rêche, induit une réponse nociceptive dans la moelle épinière, c'est l'allodynie⁶⁴. Notre étude a mesuré la réponse à une allodynie induite par injection d'un produit inflammatoire dans la moelle épinière, avec notamment une exacerbation de la réponse hémodynamique, cohérente avec la littérature⁵⁹. Cette exacerbation de la réponse évoquée suggère une augmentation de l'activité neuronale locale. Les neurones ont une augmentation à la fois de leur activité spontanée ainsi que une réponse plus importante aux stimuli non-nociceptifs⁶⁵, et, à travers la cascade menant au couplage neurovasculaire, sont probablement responsables de cette augmentation de la réponse hémodynamique évoquée.

2.5.3. Vers une imagerie bimodale de la moelle épinière

Il est intéressant, au-delà de l'imagerie Doppler de la moelle épinière, de se demander quels sont les mécanismes du couplage neurovasculaire dans cette dernière. De nombreuses expérimentations ont été effectuées en utilisant l'électrophysiologie^{41,66,67}, ainsi que quelques études de la réponse neurovasculaire, dont le présent travail. Cependant, aucune étude n'a été effectuée dans la moelle épinière en utilisant deux modalités d'imageries permettant l'accès à des grandeurs différentes, comme l'activité neuronale ou l'activité électrique de champ proche (en utilisant l'électrophysiologie) et l'activité BOLD obtenue par IRM ou le VSS obtenu par imagerie Doppler. Si une étude couple l'électrophysiologie au BOLD⁶⁸ dans le cerveau de primates anesthésiés, la miniaturisation des éléments permettant l'imagerie Doppler en font une modalité de choix pour le couplage entre l'électrophysiologie et l'imagerie Doppler. Il pourrait donc être très intéressant de mettre au point une imagerie bimodale pour l'étude de la moelle épinière chez le rat, tant pour l'aspect de l'étude du couplage neurovasculaire sans altérations pathologiques que pour l'investigation de pathologies spinales (comme, par exemple, les réorganisations fonctionnelles dues à une douleur chronique) et la pharmacologie pour le traitement de ces dernières.

En conclusion, cette étude démontre la faisabilité de l'utilisation de l'imagerie ultrasonore ultrarapide pour l'imagerie de la moelle épinière et son utilisation afin d'obtenir des informations sur la physiologie de la moelle épinière, sur la pathologie de la moelle ainsi que sur la pharmacologie de molécules appliquées sur la moelle épinière.

2.6. Bibliographie du chapitre

1. Lawrence, J., Stroman, P. W., Bascaramurty, S., Jordan, L. M. & Malisza, K. L. Correlation of functional activation in the rat spinal cord with neuronal activation detected by immunohistochemistry. *NeuroImage* **22**, 1802–1807 (2004).
2. Lilja, J. *et al.* Blood Oxygenation Level-Dependent Visualization of Synaptic Relay Stations of Sensory Pathways along the Neuroaxis in Response to Graded Sensory Stimulation of a Limb. *J. Neurosci.* **26**, 6330–6336 (2006).
3. Majcher, K. *et al.* Simultaneous functional magnetic resonance imaging in the rat spinal cord and brain. *Exp. Neurol.* **197**, 458–464 (2006).
4. Malisza, K. L. *et al.* Functional MRI of the rat lumbar spinal cord involving painful stimulation and the effect of peripheral joint mobilization. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **18**, 152–159 (2003).
5. Malisza, K. L. *et al.* FUNCTIONAL MAGNETIC RESONANCE IMAGING OF THE SPINAL CORD DURING SENSORY STIMULATION IN DIABETIC RATS. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **30**, 271–276 (2009).
6. Zhao, F., Zhao, T., Zhou, L., Wu, Q. & Hu, X. BOLD Study of Stimulation-Induced Neural Activity and Resting-State Connectivity in Medetomidine-Sedated Rat. *NeuroImage* **39**, 248–260 (2008).
7. Zhao, F. *et al.* fMRI investigation of the effect of local and systemic lidocaine on noxious electrical stimulation-induced activation in spinal cord. *Pain* **145**, 110–119 (2009).
8. Piché, M., Paquette, T. & Leblond, H. Tight neurovascular coupling in the spinal cord during nociceptive stimulation in intact and spinal rats. *Neuroscience* **355**, 1–8 (2017).

9. Brooks, J. C. W. *et al.* Stimulus site and modality dependence of functional activity within the human spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 6231–6239 (2012).
10. Cohen-Adad, J. Functional Magnetic Resonance Imaging of the Spinal Cord: Current Status and Future Developments. *Semin. Ultrasound CT MRI* **38**, 176–186 (2017).
11. Cahill, C. M. & Stroman, P. W. Mapping of neural activity produced by thermal pain in the healthy human spinal cord and brain stem: a functional magnetic resonance imaging study. *Magn. Reson. Imaging* **29**, 342–352 (2011).
12. Sprenger, C., Finsterbusch, J. & Büchel, C. Spinal cord-midbrain functional connectivity is related to perceived pain intensity: a combined spino-cortical fMRI study. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **35**, 4248–4257 (2015).
13. Stroman, P. W., Tomanek, B., Krause, V., Frankenstein, U. N. & Malisza, K. L. Mapping of neuronal function in the healthy and injured human spinal cord with spinal fMRI. *NeuroImage* **17**, 1854–1860 (2002).
14. Stroman, P. W., Bosma, R. L. & Tsyben, A. Somatotopic arrangement of thermal sensory regions in the healthy human spinal cord determined by means of spinal cord functional MRI. *Magn. Reson. Med.* **68**, 923–931 (2012).
15. Bear, M. F. *et al.* Exploring the brain. *Neurosci. Williams Wilkins* (1996).
16. Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **139**, 267–284 (2009).
17. Peyron, R., Laurent, B. & García-Larrea, L. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis (2000). *Neurophysiol. Clin. Neurophysiol.* **30**, 263–288 (2000).

18. Li, Y. *et al.* Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye DiI. *Nat. Protoc.* **3**, 1703–1708 (2008).
19. Thibault, K., Calvino, B. & Pezetl, S. Characterisation of sensory abnormalities observed in an animal model of multiple sclerosis: A behavioural and pharmacological study. *Eur. J. Pain* **15**, 231.e1-231.e16 (2011).
20. Thibault, K. *et al.* Molecular Mechanisms Underlying the Enhanced Analgesic Effect of Oxycodone Compared to Morphine in Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *PLoS ONE* **9**, (2014).
21. Thibault, K. *et al.* Activation-dependent subcellular distribution patterns of CB1 cannabinoid receptors in the rat forebrain. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* **23**, 2581–2591 (2013).
22. Chang, C. & Shyu, B. C. A fMRI study of brain activations during non-noxious and noxious electrical stimulation of the sciatic nerve of rats. *Brain Res.* **897**, 71–81 (2001).
23. Silva, A. C., Lee, S. P., Iadecola, C. & Kim, S. G. Early temporal characteristics of cerebral blood flow and deoxyhemoglobin changes during somatosensory stimulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **20**, 201–206 (2000).
24. Le Bars, D., Dickenson, A. H. & Besson, J.-M. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *PAIN* **6**, 283–304 (1979).
25. McMahon, S. B., Lewin, G. R. & Wall, P. D. Central hyperexcitability triggered by noxious inputs. *Curr. Opin. Neurobiol.* **3**, 602–610 (1993).
26. Rosa, P. N., Figueiredo, P. & Silvestre, C. J. On the distinguishability of HRF models in fMRI. *Front. Comput. Neurosci.* **9**, (2015).

27. Cao, Y. *et al.* Three-dimensional imaging of microvasculature in the rat spinal cord following injury. *Sci. Rep.* **5**, 12643 (2015).
28. Couture, O., Hingot, V., Heiles, B., Muleki-Seya, P. & Tanter, M. Ultrasound Localization Microscopy and Super-Resolution: A State of the Art. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **65**, 1304–1320 (2018).
29. Errico, C. *et al.* Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature* **527**, 499–502 (2015).
30. Hingot, V. *et al.* Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in Ultrasound Localization Microscopy. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
31. He, J.-W., Liu, H. & Peng, Y. B. Hemodynamic and Light-Scattering Changes of Rat Spinal Cord and Primary Somatosensory Cortex in Response to Innocuous and Noxious Stimuli. *Brain Sci.* **5**, 400–418 (2015).
32. Frostig, R. D., Lieke, E. E., Ts'o, D. Y. & Grinvald, A. Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6082–6086 (1990).
33. Latremoliere, A. & Woolf, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* **10**, 895–926 (2009).
34. Dickenson, A. H. & Sullivan, A. F. Differential effects of excitatory amino acid antagonists on dorsal horn nociceptive neurones in the rat. *Brain Res.* **506**, 31–39 (1990).
35. Todd, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 823–836 (2010).

36. Lindquist, M. A., Meng Loh, J., Atlas, L. Y. & Wager, T. D. Modeling the hemodynamic response function in fMRI: Efficiency, bias and mis-modeling. *NeuroImage* **45**, S187–S198 (2009).
37. Buxton, R. B., Uludağ, K., Dubowitz, D. J. & Liu, T. T. Modeling the hemodynamic response to brain activation. *NeuroImage* **23 Suppl 1**, S220-233 (2004).
38. Aydin, A.-K. *et al.* Transfer functions linking neural calcium to single voxel functional ultrasound signal. *Nat. Commun.* **11**, 2954 (2020).
39. Errico, C. *et al.* Transcranial functional ultrasound imaging of the brain using microbubble-enhanced ultrasensitive Doppler. *NeuroImage* **124**, 752–761 (2016).
40. Dizeux, A. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates. *Nat. Commun.* **10**, 1–9 (2019).
41. Menétrey, D., Giesler, G. J. & Besson, J. M. An analysis of response properties of spinal cord dorsal horn neurones to nonnoxious and noxious stimuli in the spinal rat. *Exp. Brain Res.* **27**, 15–33 (1977).
42. Woolf, C. J. & Fitzgerald, M. Somatotopic organization of cutaneous afferent terminals and dorsal horn neuronal receptive fields in the superficial and deep laminae of the rat lumbar spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **251**, 517–531 (1986).
43. Swett, J. E. & Woolf, C. J. The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **231**, 66–77 (1985).
44. Kuner, R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat. Med.* **16**, 1258–1266 (2010).
45. Bimbard, C. *et al.* Multi-scale mapping along the auditory hierarchy using high-resolution functional UltraSound in the awake ferret. *eLife* **7**, e35028 (2018).

46. Gesnik, M. *et al.* 3D functional ultrasound imaging of the cerebral visual system in rodents. *Neuroimage* **149**, 267–274 (2017).
47. Osmanski, B. F. *et al.* Functional ultrasound imaging reveals different odor-evoked patterns of vascular activity in the main olfactory bulb and the anterior piriform cortex. *NeuroImage* **95**, 176–184 (2014).
48. Rahal, L. *et al.* Ultrafast ultrasound imaging pattern analysis reveals distinctive dynamic brain states and potent sub-network alterations in arthritic animals. *Sci. Rep.* **10**, 10485 (2020).
49. Blaize, K. *et al.* Functional ultrasound imaging of deep visual cortex in awake nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 14453–14463 (2020).
50. Rabut, C. *et al.* 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents. *Nat. Methods* **16**, 994 (2019).
51. Sauvage, J. *et al.* A large aperture row column addressed probe for in vivo 4D ultrafast doppler ultrasound imaging. *Phys. Med. Biol.* **63**, 215012 (2018).
52. Tiran, E. *et al.* Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent. *Ultrasound Med. Biol.* **43**, 1679–1689 (2017).
53. Demene, C. *et al.* Functional ultrasound imaging of brain activity in human newborns. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
54. Imbault, M., Chauvet, D., Gennisson, J.-L., Capelle, L. & Tanter, M. Intraoperative Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity. *Sci. Rep.* **7**, 1–7 (2017).
55. Coghill, R. C., Price, D. D., Hayes, R. L. & Mayer, D. J. Spatial distribution of nociceptive processing in the rat spinal cord. *J. Neurophysiol.* **65**, 133–140 (1991).

56. Kadekaro, M., Crane, A. M. & Sokoloff, L. Differential effects of electrical stimulation of sciatic nerve on metabolic activity in spinal cord and dorsal root ganglion in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 6010–6013 (1985).
57. Marcus M L, Heistad D D, Ehrhardt J C & Abboud F M. Regulation of total and regional spinal cord blood flow. *Circ. Res.* **41**, 128–134 (1977).
58. Sasaki, S. *et al.* Optical imaging of intrinsic signals induced by peripheral nerve stimulation in the in vivo rat spinal cord. *NeuroImage* **17**, 1240–1255 (2002).
59. T, R. *et al.* Spinal and supraspinal processing of thermal stimuli: an fMRI study. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* vol. 41
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24737401/> (2015).
60. Weber, K. A., Chen, Y., Wang, X., Kahnt, T. & Parrish, T. B. Functional magnetic resonance imaging of the cervical spinal cord during thermal stimulation across consecutive runs. *NeuroImage* **143**, 267–279 (2016).
61. P, N. *et al.* Functional magnetic resonance imaging identifies somatotopic organization of nociception in the human spinal cord. *Pain* vol. 154
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23618495/> (2013).
62. Takahashi, Y., Chiba, T., Kurokawa, M. & Aoki, Y. Dermatomes and the central organization of dermatomes and body surface regions in the spinal cord dorsal horn in rats. *J. Comp. Neurol.* **462**, 29–41 (2003).
63. Takahashi, Y. & Nakajima, Y. Dermatomes in the rat limbs as determined by antidromic stimulation of sensory C-fibers in spinal nerves. *Pain* **67**, 197–202 (1996).
64. Jensen, T. S. & Finnerup, N. B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol.* **13**, 924–935 (2014).

65. McGaraughty, S., Chu, K. L. & Xu, J. Characterization and pharmacological modulation of noci-responsive deep dorsal horn neurons across diverse rat models of pathological pain. *J. Neurophysiol.* **120**, 1893–1905 (2018).
66. Laird, J. M. & Bennett, G. J. An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord of rats with an experimental peripheral neuropathy. *J. Neurophysiol.* **69**, 2072–2085 (1993).
67. Urch, C. E. & Dickenson, A. H. In vivo single unit extracellular recordings from spinal cord neurones of rats. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **12**, 26–34 (2003).
68. Logothetis, N. K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T. & Oeltermann, A. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* **412**, 150–157 (2001).

2.7. Annexes

		Description du nombre d'animaux et des acquisitions			
Figure	Panel	Condition	Nbre d'animaux utilisés	Nbre d'acquisitions	Nbre total de stimulations
Réponses hémodynamiques évoquées par des stimuli naturels nociceptif et non nociceptif	Nociceptif	Baseline	5	13	65
		Dorsal horn	5	13	52
		Ventral horn	5	11	44
		Caudal area	5	12	48
	Non nociceptif	Baseline	4	6	30
		Dorsal horn	4	6	24
		Ventral horn	4	6	24
		Caudal area	4	6	24

		Modèle Linéaire Mixte						
Figure	Panel	Condition	Transformation	pval : homoscedasticity	pval : residual normality	pval : condition	pval : animals	pval : Acquisition
Réponses hémodynamiques évoquées par des stimuli naturels nociceptif et non nociceptif	Nociceptif	Baseline	sign(x)*sqrt(abs(x))	0,11	0,02	2,40E-11	0,057	0,057
		Dorsal horn						
		Ventral horn						
		Caudal area						
	Non nociceptif	Baseline	sign(x)*sqrt(abs(x))	0,49	0,02	1,20E-42	0,28	0,28
		Dorsal horn						
		Ventral horn						
		Caudal area						

Figure	Panel	Conditions comparées		p-valeur
Réponses hémodynamiques évoquées par des stimuli naturels nociceptif et non nociceptif	Nociceptif	Baseline	Caudal	6,80E-02
		Baseline	Dorsal	3,60E-12
		Baseline	Ventral	3,20E-05
		Caudal	Dorsal	9,20E-08
		Caudal	Ventral	1,90E-02
		Dorsal	Ventral	1,30E-03
	Non Nociceptif	Baseline	Caudal	1
		Baseline	Dorsal	7,80E-39
		Baseline	Ventral	1,40E-10
		Caudal	Dorsal	3,30E-35
		Caudal	Ventral	1,30E-09
		Dorsal	Ventral	1,70E-14

ANNEXE 1 : TABLEAU RECAPITULATIF DES DONNEES STATISTIQUES POUR LES STIMULI NATURELS NOCICEPTIFS ET NON-NOCICEPTIFS DANS LA MOELLE EPINIERE.

		Description du nombre d'animaux et des acquisitions			
Figure	Panel	Condition	Nbre d'animaux utilisés	Nbre d'acquisitions	Nbre total de stimulations
Réponse hémodynamique évoquées par stimulations électriques	Sagittal	Baseline	9	21	105
		3 mA	9	21	84
		1,5 mA	5	12	48
		0,5 mA	6	9	36
		3 mA + Kétamine	4	4	16
	Transversal	Baseline	5	12	60
		Ipsilateral	5	12	48
		Contralateral	5	12	48

		Modèle Linéaire Mixte						
Figure	Panel	Condition	Transformation	pval : homoscedasticity	pval : residual normality	pval : condition	pval : animals	pval : Acquisition
Réponse hémodynamique évoquées par stimulations électriques	Sagittal	Baseline	sign(x)*sqrt(abs(x))	0,015	2,00E-06	8,00E-56	0,06	0,06
		3 mA						
		1,5 mA						
		0,5 mA						
		3 mA + Kétamine						
	Transversal	Baseline	sign(x)*sqrt(abs(x))	0,86	0,24	7,30E-33	0,076	0,08
		Ipsilateral						
		Contralateral						

Figure	Panel	Conditions comparées		p-valeur
Réponse hémodynamique évoquées par stimulations électriques	Sagittal	Baseline	0,5 mA	4,60E-01
		Baseline	1,5 mA	3,60E-27
		Baseline	3 mA	7,80E-50
		Baseline	3 mA + Ketamine	8,00E-01
		0,5 mA	1,5 mA	9,40E-18
		0,5 mA	3 mA	7,90E-31
		0,5 mA	3 mA + Ketamine	7,90E-01
		1,5 mA	3 mA	1,50E-03
		1,5 mA	3 mA + Ketamine	4,30E-12
		3 mA	3 mA + Ketamine	9,20E-20
	Transversal	Baseline	Ipsilateral	4,60E-30
		Baseline	Contralateral	6,90E-01
		Ipsilateral	Contralateral	4,70E-27

ANNEXE 2 : TABLEAU RECAPITULATIF DES DONNEES STATISTIQUES POUR LES STIMULATIONS ELECTRIQUES DU SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE A DIFFERENTES INTENSITES.

		Description du nombre d'animaux et des acquisitions			
Figure	Panel	Condition	Nbre d'animaux utilisés	Nbre d'acquisitions	Nbre total de stimulations
Imagerie d'une allodynie inflammatoire induite	Tous	Saline	7	19	76
		CFA	7	24	96

		Modèle Linéaire Mixte						
Figure	Panel	Condition	Transformation	pval : homoscedasticity	pval : residual normality	pval : condition	pval : animals	pval : Acquisition
Imagerie d'une allodynie inflammatoire induite	Tous	Saline	$\text{sign}(x) \cdot \sqrt{\text{abs}(x)}$	0,13	0,009	2,00E-18	6,00E-06	0,83
		CFA	$\text{sign}(x) \cdot \sqrt{\text{abs}(x)}$					

ANNEXE 3 : TABLEAU RECAPITULATIF DES DONNEES STATISTIQUES POUR LES STIMULATIONS MECANIQUES TACTILES DANS UN CADRE PHYSIOLOGIQUE ET PHYSIOPATHOLOGIQUE INFLAMMATOIRE.

Chapitre 3. Imagerie fonctionnelle des champs oculomoteurs supplémentaires chez le primate non-humain

Les saccades sont parmi les mouvements oculaires les plus courants (avec la poursuite et la vergence et les réflexes vestibulo-oculaire et optocinétiques) et permettent de garder la fovéa de la rétine sur l'objet que l'on désire fixer. Pour ce qui concerne les déplacements brusques du regard, les saccades regroupent deux grands « groupes » : les saccades réflexes, mouvement oculaire vers un stimulus qui apparaît de façon prédictif dans le champ visuel, ou les saccades volontaires, qui permettent une mise au point sur un objet du champ de vue en déplaçant la fovéa sur ce dernier. Les voies neuro-anatomiques qui contrôlent les saccades volontaires ou réflexes sont différentes et nous nous intéresserons dans cette thèse majoritairement aux saccades volontaires. Présentes uniquement chez les primates, deux grandes zones^{xiii} entrent dans le contrôle et la supervision des saccades volontaires : les champs oculomoteurs frontaux (COF) et les champs oculomoteurs supplémentaires (COS). Le rôle du COF est relativement bien défini dans la littérature¹⁻⁴ et permet un contrôle moteur des saccades (notamment en fonction de leur amplitude⁵). Le rôle du COS, défini au contraire de manière moins évidente dans les travaux scientifiques^{6,7}, est de plus haut niveau dans la hiérarchie du contrôle des mouvements oculomoteurs. Nous allons, dans ce chapitre, nous intéresser au rôle du COS dans le contrôle de la motivation lors d'une tâche oculomotrice, avec notamment le suivi d'une grandeur comportementale directement liée à la motivation : la pupille^{8,9}. Nous commencerons par une brève introduction à la genèse des mouvements oculomoteurs dans le cerveau, avant de nous intéresser au lien entre cerveau et comportement. Nous étudierons ensuite le rôle de la pupille dans le suivi de la motivation, par le prisme notable de son rôle dans la mesure de l'effort avant de décrire les différents résultats obtenus sur le lien entre COS et pupille chez deux macaques rhésus (*macaca mulatta*). Ces résultats s'articuleront entre tâche oculomotrice et latence des saccades, lien entre le signal ultrasonore fonctionnel mesuré dans COS et le diamètre mesuré de la

^{xiii} Ce ne sont évidemment pas les seules zones permettant le contrôle des mouvements oculomoteurs, mais nous nous intéresserons principalement à ces zones-ci.

pupille, modulation directe de l'activité pupillaire et du COS par modulation de la récompense et enfin, mesure de la réponse hémodynamique et pupillaire chez le primate ; cela afin de déterminer le lien fonctionnel entre le COS et la pupille.

3.1. Introduction

L'œil est un organe constamment en mouvement : nous en réalisons quotidiennement l'expérience lorsque notre regard explore un visage, un objet, etc. ; les différents mouvements des yeux peuvent être distingués entre mouvements réflexes et mouvements volontaires. Les mouvements réflexes sont au nombre de deux :

- Le réflexe vestibulo-oculaire qui permet de stabiliser le regard pendant un mouvement de la tête. C'est un réflexe court (à 3 neurones) mettant en jeu le système vestibulaire de l'oreille interne et les muscles oculomoteurs. Brièvement, la détection de mouvement dans le système vestibulaire inhibe les muscles d'un côté de l'œil et excite les de l'autre côté, permettant une stabilisation du regard (Figure 56). Le réflexe vestibulo-oculaire est capable de compenser des mouvements à la fois en translation et en rotation ; il s'agit de l'un des réflexes les plus rapides du corps humain
- Le réflexe opto-cinétique ou réflexe OKR pour *optokinetic reflex*, permet de faire suivre du regard un objet en mouvement très rapide. Il s'agit des mouvements des yeux que nous observons quand nous regardons une personne fixant l'extérieur dans le train ou dans le métro. A la suite d'une poursuite oculaire est effectuée une saccade pour ramener l'œil dans une position plus centrale, c'est le nystagmus.

Après les mouvements réflexes des yeux, nous nous intéresserons aux mouvements volontaires ; ceux-ci peuvent être décomposés en trois grandes familles :

- Les mouvements de vergence, qui sont les seuls mouvements oculaires déconjugés, permettent de changer l'orientation des yeux en fonction de la distance en profondeur de l'objet visé. Faire loucher quelqu'un est un exemple de vergence.

- Les mouvements de poursuite oculaire, capacité de l'œil de suivre une cible en mouvement sans que ladite cible ne s'éloigne de la fovéa de l'œil. La poursuite oculaire est un mouvement fluide sans saccade de rattrapage (sauf pour les mouvements dont la vitesse est supérieure à $30^\circ/\text{sec}$).
- Les mouvements de saccade, capacité de l'œil à effectuer des mouvements très rapides (vitesse maximale aux alentours de $600^\circ/\text{sec}$) et très courts (de l'ordre de 50 à 100 ms) ; ils permettent d'amener très rapidement un objet dans la fovéa. Il existe différentes saccades dont les saccades réflexes, volontaires, le *rapid eye movement* (période du sommeil caractérisée par des saccades des yeux) sont des exemples.

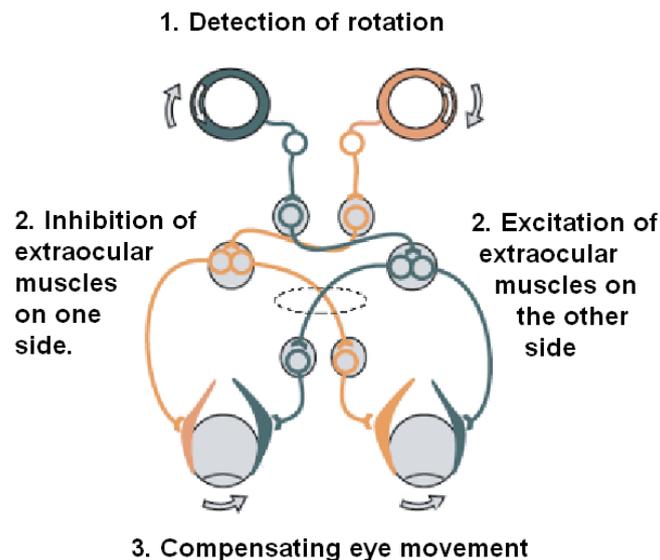


Figure 56. Réflexe vestibulo-oculaire à 3 neurones pour la stabilisation du regard lors d'un mouvement de la tête.^{xiv}

^{xiv} Par User:Mikael Häggström — Image:ThreeNeuronArc.png Original uploader was Tvil at en.wikipedia, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2980751>

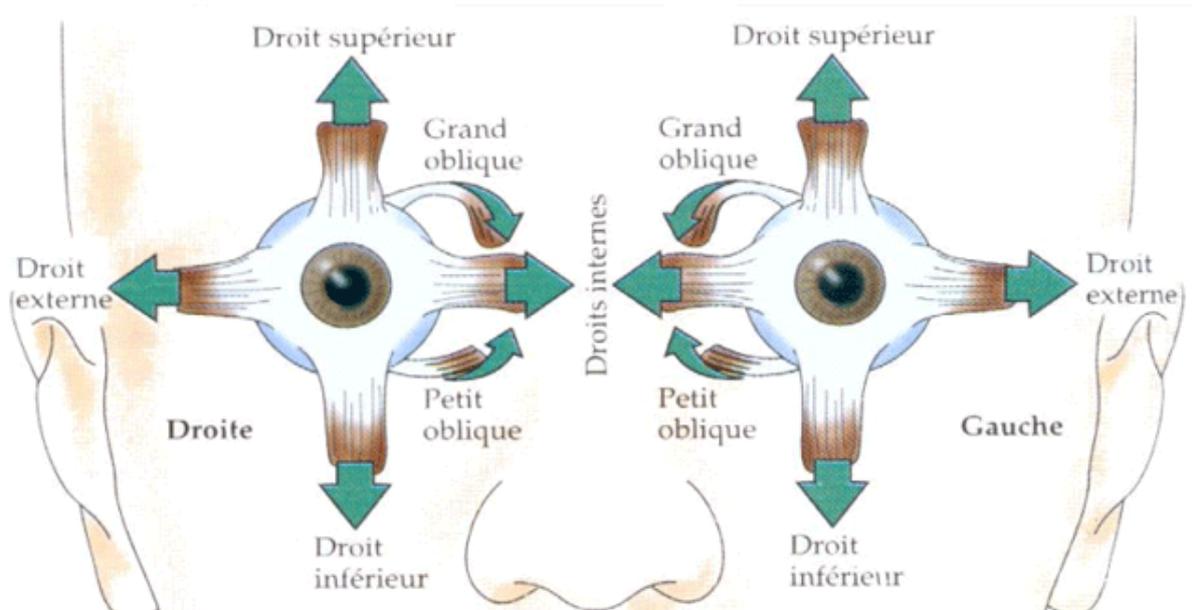


Figure 57. Chaque œil possède 6 muscles oculomoteurs permettant les mouvements de l'œil comme décrit précédemment^{xv}

3.1.1. Genèse des mouvements oculomoteurs

3.1.1.1. Genèse des mouvements moteurs

Les muscles oculaires sont contrôlés par une série de motoneurones, eux même contrôlés par des sous-populations neuronales du tronc cérébral : il s'agit du plus bas-niveau de contrôle des mouvements oculaires. Les muscles reçoivent des informations directes des motoneurones (MN), situés dans le tronc cérébral. Les motoneurones sont modulés directement par 2 populations neuronales : les neurones à décharge par salve (*burst neuron*, BN), déchargeant à haute fréquence au moment de l'initiation d'une saccade et les neurones toniques (TN), Intégrant l'information en provenance des BN pour maintenir l'excentricité du regard après la saccade. Les *burst neurons* sont inhibés par une population de neurones responsables de la fixation, appelés les neurones omnipauses (OPN), formant une inhibition monosynaptique puissante sur les BN. Les neurones omnipauses déchargent de façon tonique pendant une fixation ; juste avant une saccade, les OPN arrêtent les décharges toniques et lèvent l'inhibition latente sur les neurones à décharge par salve, permettant l'initiation de la saccade.

^{xv} D'après http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/neurosciences/actualisation-des-connaissances/perception-sensorielle-1/vision/comprendre/VisionMarseille/supp_anato_mvts_ocul

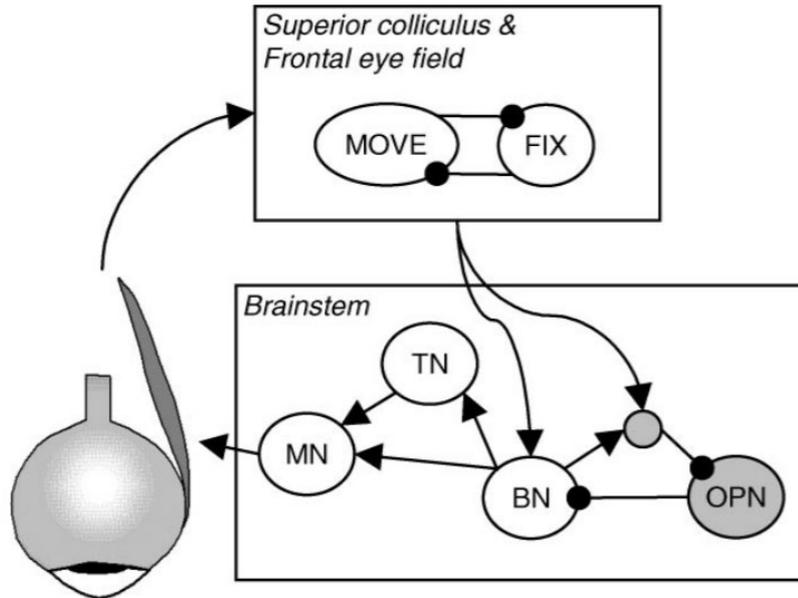


Figure 58. Schéma simplifié du contrôle par le tronc cérébral, le colliculus supérieur et les champs oculomoteurs frontaux du contrôle des mouvements oculaires. MOVE : Movement Neurons, FIX : Neurone de fixation, MN : MotoNeurones, TN : Neurone Tonique, BN : Burst Neurone, OPN : Omnipause Neurone. Les flèches sont des synapses excitatrices, les ronds des synapses inhibitrices. d'après Schall, 2004¹⁰.

Une fois la saccade effectuée, les neurones omnipauses réinstallent l'inhibition sur les BN. La partie visuomotrice du tronc cérébral est contrôlée par des structures sous-corticales et corticales : le colliculus supérieur et les champs oculomoteurs frontaux. Dans ces structures, des neurones de mouvement et de fixation s'inhibent mutuellement en fonction du mouvement à effectuer et vont exciter ou inhiber les neurones à décharges par salve ou bien les neurones omnipauses (Figure 58)

Au-delà des chemins neuronaux de contrôle moteur des muscles oculomoteurs, il est intéressant de se pencher plus en détail sur les contrôles sous-corticaux et corticaux permettant l'initiation et le contrôle des saccades réflexes et des saccades volontaires.

3.1.2. Contrôle cortical des mouvements de saccade

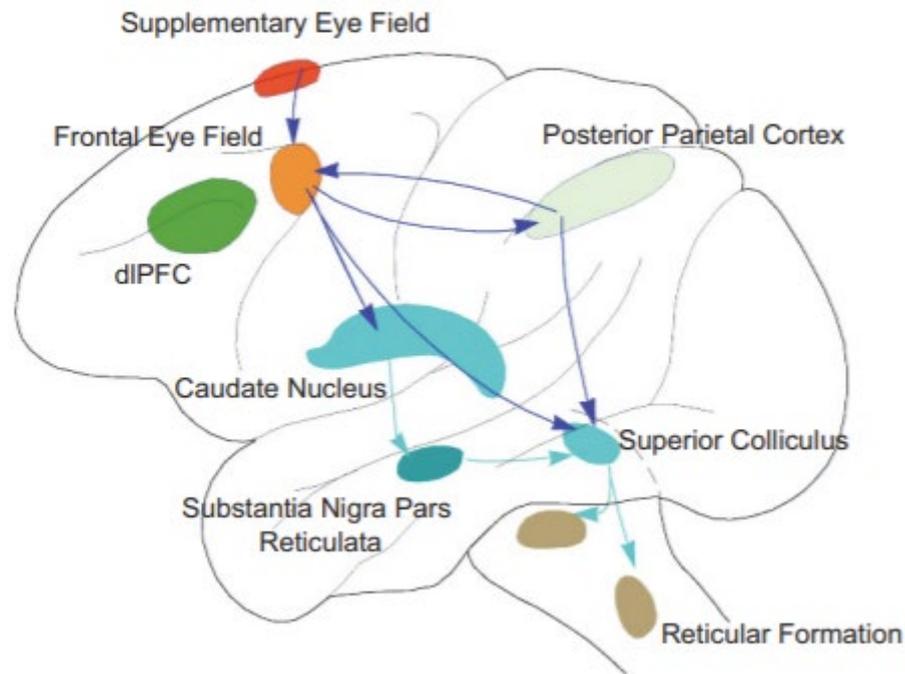


Figure 59. Aires corticales rentrant en jeu dans le contrôle saccadique, d'après Pouget, 2015¹¹

Les saccades sont contrôlés par différentes aires visuomotrices du cortex, notamment selon leur caractère réflexe ou volontaire. Si dans notre cas, nous étudions majoritairement les saccades volontaires vers une cible, il est important de connaître le chemin empruntés par les saccades réflexes. Ces dernières doivent en effet être inhibées pour conduire à la réalisation d'une antisaccade lors des tâches visuelles complexes auxquelles sont entraînés nos primates non-humains.

3.1.2.1. Contrôle cortical des mouvements de saccade réflexe

L'attention visuelle est le mécanisme par lequel le système nerveux central focalise son attention sur des fragments du champ visuel : les saccades courtes sont l'un des moyens qui permet d'explorer son environnement et de porter son attention sur ses différentes parties. Ces saccades, très rapides (de l'ordre de 60 ms à 120 ms) sont qualifiées de saccades réflexes ou express.

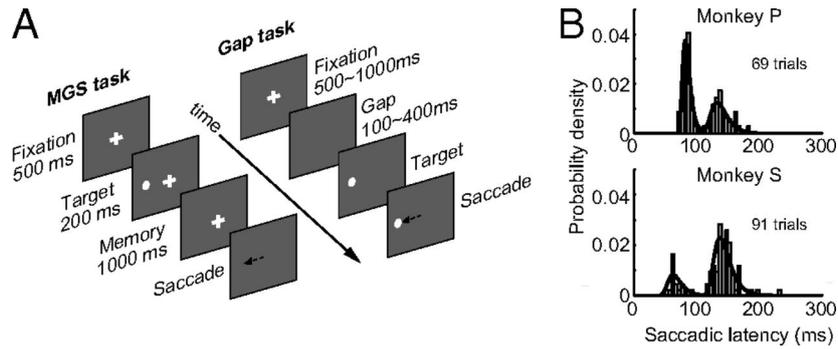


Figure 60. D'après Chen *et al.*,¹². Tâches comportementales et distribution des latences de saccades. A) Taches comportementales de Chen et al, permettant la mesure bimodale des saccades chez les 2 singes P et S. B) Bimodalité des latences de saccades : saccades express vers 100 ms et moins, et saccades volontaires vers 150/200 ms.

Le contrôle des saccades réflexes est très probablement sous-cortical, ne passant pas par le cortex frontal mais restent limitées au lobe intrapariéal postérieur^{12,13} (aire responsable, entre autre, de l'attention visuelle) et au colliculus supérieur¹⁴⁻¹⁷. Cependant, les champs oculomoteurs frontaux, responsables de l'activité globale de saccade (comme nous l'avons vu en 3.1.1.1 avec les neurones MOVE et FIX) rentrent en compte dans la genèse motrice des saccades mais ne supervisent pas les saccades express, ne montrant pas une activité exacerbée lors de ce type de saccades¹⁸.

Les aires corticales préfrontales ne jouent pas de rôle dans le contrôle des saccades réflexes mais jouent un rôle important dans la supervision et le contrôle des saccades volontaires.

3.1.2.2. Contrôle cortical des mouvements de saccade volontaire

Les saccades volontaires sont, au contraire des saccades express, d'une latence plus longue : ce sont des saccades déclenchées de manière endogène pour diriger son regard vers un stimulus donné. Le système de supervision des saccades volontaires est différent du système de supervision des saccades réflexes ; dans le cortex frontal, le système de supervision des mouvements de saccades comprend les champs oculomoteurs frontaux (COF, en orange sur Figure 59), responsables des mouvements de poursuite oculaire et de saccade, les champs oculomoteurs supplémentaires (COS, en rouge sur la Figure 59) et le cortex préfrontal dorsolatéral (dlPFC, vert foncé sur la Figure 59). Si nous voulons étudier le rôle de chacune de ces aires corticales dans la supervision et le

guidage des saccades volontaires, l'un des paradigmes en permettant l'étude se base sur la réalisation d'antisaccades : pour produire cette dernière, le sujet doit d'abord inhiber la saccade réflexe vers l'objet présenté avant de programmer et de réaliser la saccade du côté opposé.

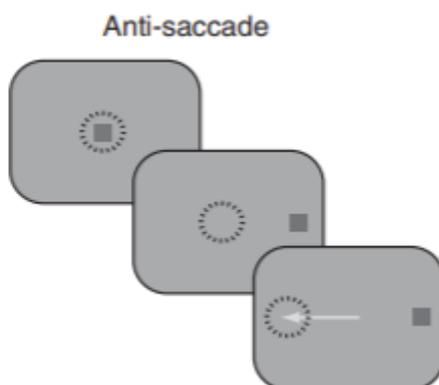


Figure 61. Paradigme d'antisaccade pour l'étude de saccades volontaires, d'après Pouget, 2015¹¹. Le paradigme consiste en une saccade à l'opposé de l'objet guidant la saccade

Lors d'une antisaccade, le COF s'active plus intensément et plus tôt que lors d'une saccade^{19,20}, montrant l'implication de cette aire corticale dans la réalisation du paradigme de saccades réflexes inhibées. Cependant, même si des résultats de Schlag-Rey et ceux de Brown démontrent l'importance du COF dans la réalisation de saccades volontaires, les champs oculomoteurs supplémentaires et le cortex préfrontal dorsolatéral présentent aussi une activité accrue lors de la préparation d'antisaccades¹⁹, suggérant l'implication de ces aires corticales dans l'inhibition des saccades volontaires pour la réalisation des antisaccades, *via* le COF ou directement au colliculus supérieur travers un faisceau préfrontocolliculaire²¹.

De ces différentes aires de contrôle corticale des mouvements de saccades (volontaires, dans notre cas, la tâche étant complexe et nécessitant une reconnaissance des formes avant le processus décisionnel d'effectuer une saccade ou une antisaccade), nous étudions les champs oculomoteurs supplémentaires et le cortex cingulaire antérieur ; nous allons nous intéresser plus en détail à ces deux aires corticales avant de nous intéresser à la pupille, grandeur comportementale clef de cette étude.

3.1.3. Champ oculomoteur supplémentaire (COS)

Situé dans la partie rostrale de l'aire motrice supplémentaire au niveau du gyrus frontal supérieur (voir Figure 59 en rouge), le champ oculomoteur supplémentaire, ou COS, joue un rôle indirect dans le contrôle des saccades. Appartenant au cortex frontal, zone corticale connue pour son implication dans la supervision, le suivi et la sélection de comportements, le COS applique ces rôles aux mouvements oculomoteurs. Des études neurophysiologiques, avec notamment l'inhibition du COS, suggèrent qu'il ne joue pas un rôle dans la production de saccades, mais joue un rôle dans le contrôle et la supervision des mouvements oculomoteurs en représentant le contexte et les conséquences de chacun des mouvements possibles : le COS permet de superviser et de diriger les actions des aires oculomotrices primaires afin de guider la décision vers le choix le plus optimal possible²².

3.1.3.1. Rôle du COS dans la sélection d'un comportement

La prise de décision est un acte d'évaluation des possibilités de résultats conduisant au meilleur comportement possible. Ces processus de sélection des résultats, qui sont une composante non-motrice d'une action, ne permettent pas, *per se*, de choisir une des options : il est nécessaire de coupler la prise de décision avec une action motrice pour la sélection d'une option donnée. Le COS semble jouer un rôle dans le processus de sélection d'un comportement dans le cadre de mouvements oculomoteurs. Dans certaines tâches induisant une forte mobilisation du COS dans la sélection d'un comportement, comme une tâche de « pari »²², plusieurs types de neurones sont mesurés dans le COS : premièrement, une population encodant la valeur de la récompense, indépendamment de la tâche oculomotrice à effectuer, une seconde population combinant la valeur de la récompense avec le mouvement oculomoteur (position, direction) et enfin une population de neurones ne montrant une activité que pour les mouvements oculomoteurs effectués. De plus, l'information de valeur semble encodée avant l'information de direction, suggérant que le COS sert de pont pour relier le système encodant la valeur (et, entre autre, comme nous le verrons plus tard, le cortex cingulaire antérieur) et le système encodant l'information motrice. Lors d'une prise de décision impliquant une valeur de récompense, le COS semble s'activer avant les aires motrices comme le COF et le cortex pariétal postérieur²³, laissant penser que le COS joue un rôle

important dans l'encodage des actions, conduisant à une récompense, basées sur des mouvements oculaires.

Cependant, le rôle du COS ne se limite pas à la sélection d'un comportement, mais aussi à l'évaluation de ce dernier, permettant, dans un second temps, son contrôle.

3.1.3.2. Rôle du COS dans l'évaluation d'un comportement

Les résultats des actions ne sont que rarement des certitudes, et ceux-ci peuvent être incertains et/ou changer avec le temps ; il devient alors nécessaire de mettre à jour les valeurs de récompenses résultantes des actions dans un processus d'apprentissage continu. Ces processus d'apprentissages requièrent un système capable d'évaluer le résultat réel d'une action et de le comparer avec le résultat attendu. Les neurones du COS sont connus pour répondre, pour certains, à l'anticipation et pour l'autre à la délivrance d'une récompense²⁴ ou bien encore à l'erreur et au conflit entre deux réponses²⁵. L'activité neuronale dans le COS joue un rôle important dans la comparaison entre deux valeurs : la récompense attendue et la récompense obtenue, mais il semble aussi jouer un rôle important dans le suivi de bon nombre de grandeurs comportementales. Ces activités d'évaluation d'un comportement par comparaison entre l'attente et la réalité sont retrouvées dans d'autres structures corticales pour d'autres types de mouvements, comme les neurones dopaminergiques du mésencéphale²⁶ ou encore l'amygdale²⁷, structures ne nous intéressant pas dans cette étude. En conclusion, le COS est capable de suivre et de comparer une différence entre une récompense attendue et une récompense obtenue, et permet d'évaluer le résultat d'un mouvement oculomoteur lorsque celui-ci est basé sur une décision.

3.1.3.3. Rôle du COS dans le contrôle d'un comportement

Comme nous l'avons décrit plus tôt, le COS ne semble pas jouer, au contraire du COF et du colliculus supérieur, un rôle direct dans l'exécution des saccades, son inhibition n'empêchant pas la réalisation de saccades. Nous parlons ici uniquement des saccades volontaires, puisque le circuit dlPFC/COS n'est actif que dans le cadre des saccades volontaires, le circuit court COF-SC/LIP étant suffisant pour effectuer des saccades

express, comme vu en 3.1.2.1. Cependant, il est probable que le COS joue un rôle dans la supervision des saccades, des microstimulations du COS permettant d'augmenter la réussite de l'inhibition d'une tâche de *go / no-go*²⁸.

Finalement, nous avons vu que le COS est responsable de la sélection, de l'évaluation et du contrôle des mouvements oculomoteurs. Il est cependant notable que le COS n'est pas capable, *per se*, de générer des mouvements oculomoteurs, la décision finale de générer telle ou telle saccade revenant aux aires oculomotrices primaires comme le COF et le SC ; le COS n'est alors capable que d'influencer, à travers la modulation de ces aires, la sélection d'un comportement donné.

L'autre zone d'intérêt que nous imageons, située juste en dessous du COS, appartient au cortex cingulaire, il s'agit du cortex cingulaire antérieur que nous allons décrire brièvement.

3.1.4. Cortex Cingulaire Antérieur (CCA)

Situé sous le gyrus frontal supérieur, après le sulcus cingulaire, le cortex cingulaire est une structure limbique s'enroulant autour du corps calleux. Le cortex cingulaire comprend une partie antérieure, ou CCA, responsable majoritairement des fonctions exécutives et une partie postérieure (PCC pour *Posterior Cingulate Cortex*) responsable des fonctions évaluatives²⁹.

Dans notre étude, nous nous intéressons uniquement au cortex cingulaire antérieur ; ce dernier joue un rôle dans le suivi exécutif des fonctions motrices, notamment dans la détection des erreurs³¹ et le suivi des conflits. Nous nous intéressons plus particulièrement au cortex cingulaire antérieur dorsal, ou CCAd. Son rôle reste relativement flou, allant de l'intégration de l'information douloureuse³², au suivi de la performance et du conflit, à la prise de décision, à la gestion des émotions, à l'apprentissage ou encore à la motivation³³. Cependant, les multiples rôles du CCAd ont un socle commun, il s'agit d'une zone activée dans des tâches demandant un contrôle cognitif. Par exemple, des microlésions du cortex cingulaire antérieur dorsal diminuent les performances liées à des tâches demandant un fort contrôle cognitif³⁴ (dans le cadre de perte de densité liée à l'âge, pour cette publication) comme le test de Stroop.

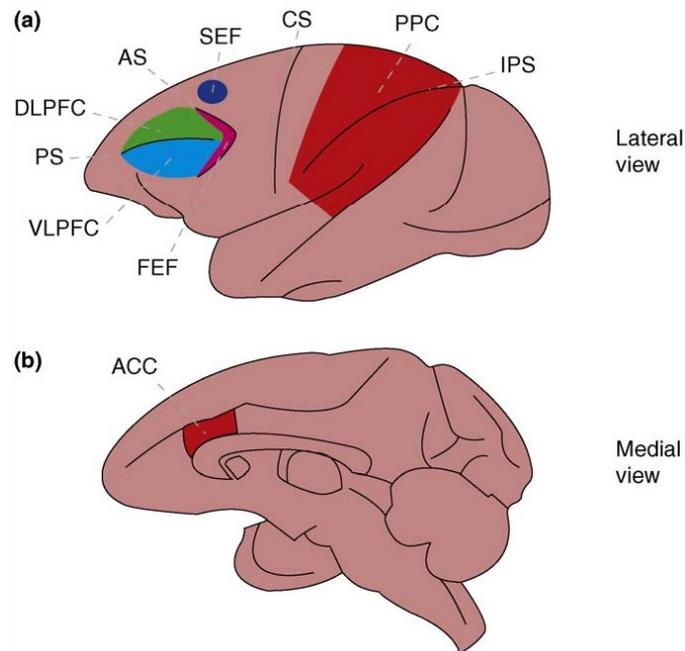


Figure 62. Localisation du cortex cingulaire antérieur (CCA, panel (b)) par rapport au COS (bleu, panel (a)) Les deux structures sont bien alignées et il est possible d’imager en une seule fois le COS et l’CCA dans le même plan. Axe gauche-droite : antéro-postérieur, d’après Stoet et al, 2009³⁰.

Une approche intégrative du rôle du CCAd, dans un but d’unification de ses fonctions est donnée par Shenhav *et al.*³³ comme étant une zone responsable de l’intégration de la valeur attendue du contrôle à exercer pour effectuer une tâche donnée, avec la comparaison de la récompense attendue par rapport à l’effort demandé. Il est suggéré que le CCAd estime la quantité de la valeur attendue du contrôle à exercer dans une tâche pour déterminer s’il est intéressant ou non d’exercer ce-dit contrôle afin d’effectuer la tâche. S’il est intéressant d’effectuer l’action, le CCAd détermine la quantité de contrôle à exercer pour effectuer la tâche, et si plusieurs possibilités sont disponibles, détermine la tâche la plus intéressante d’un point de vue coût/effort³⁵.

D'un point de vue fonctionnel, l'activité générale de suivi et de contrôle du cortex cingulaire antérieur dorsal peut être divisé en plusieurs sous activités :

- Le suivi et le contrôle de tâches conflictuelles (e.g. test de Stroop) où le CCAd joue un rôle important dans l'exercice d'un contrôle accru lorsque la tâche devient de plus en plus difficile. Par exemple, nommer la couleur du mot « bleu » n'est pas une tâche conflictuelle, le mot et la couleur du mot étant la même, mais donner la couleur du mot « vert » (rouge, donc) est une tâche conflictuelle demandant un contrôle accru de la part du CCAd³⁶
- La détermination des résultats d'une tâche : au-delà des informations sur l'état actuel de la tâche et du contrôle à exercer, le CCAd compare à la fois la valeur attendue d'une récompense, avant que celle-ci n'arrive, et la valeur une fois que celle-ci est délivrée³⁷, permettant de déterminer si la récompense est perçue positivement ou négativement. Dans le cadre d'un résultat perçu négativement, le CCAd répond à différents stimuli, comme la douleur³⁸, les erreurs dans une tâche, perte de gains, etc^{xvi}. Dans le cadre d'un résultat perçu positivement, les neurones du CCAd répondent à l'amplitude d'une récompense mais aussi à la possibilité d'une récompense^{xvi}.
- Le contrôle de la pertinence de la valeur des résultats : Compte tenu du rôle du CCAd tel que nous l'avons défini précédemment, nous pouvons penser que le CCAd répond à la valeur de n'importe quel événement. Cependant, certains auteurs suggèrent que le CCAd répond avant tout à la valeur des événements qui sont pertinents pour l'allocation du contrôle sur la tâche³³. Notamment, le CCAd est plus sensible aux résultats liés aux actions qu'aux résultats liés à des stimuli n'impliquant pas nécessairement une action^{xvii}, et l'activité du CCAd semble diminuer lorsque le besoin de contrôle sur la tâche diminue (avec, par exemple, plus d'entraînement)⁴⁰.

^{xvi} Pour une revue systématique de la littérature, voir Shenhav et al, 2013³³

^{xvii} Pour une revue, voir Rangel et Hare, 2010³⁹

Finalement, l'activité du cortex cingulaire antérieur dorsal est très lié à la notion d'effort cognitif et d'attente des résultats, ce qui explique sa possible implication dans, comme nous le verrons dans une prochaine partie, la volition chez le primate non-humain.

Un marqueur externe lié à l'effort cognitif, pouvant être mesuré de façon non-invasive chez les primates (humains et non-humain) est la pupille, qui semble impliquée dans un grand nombre de processus cognitifs liés à l'effort et à la récompense.

3.1.5. Pupille et effort cognitif

La pupille est le trou situé au milieu de l'iris et permettant à la lumière d'atteindre la rétine. Le diamètre de la pupille (de 2 à 9 mm chez l'homme) est régulé par deux groupes de muscles : les muscles sphincter de l'iris, permettant la contraction de l'iris et innervé par le système parasympathique en provenance du noyau d'Edinger-Westphal et les muscles dilatateurs de la pupille, innervé par le système sympathique, permettant sa dilatation. La pupille est le siège du réflexe photomoteur, qui correspond à une contraction (myosis) ou dilatation (mydriase) de la pupille en réponse à une stimulation lumineuse de la rétine. Ce réflexe permet de contrôler la quantité de la lumière rentrant dans l'œil.

Au-delà des aspects purement réflexes de la pupille, celle-ci est aussi le reflet d'effort cognitif : par l'observation de la modulation naturelle de la pupille avec la charge cognitive^{9,41}, il devient possible de mesurer cette dernière avec une évaluation de son diamètre.

3.1.6. Imagerie fonctionnelle ultrasonore chez le primate non-humain

L'imagerie fonctionnelle ultrasonore chez le primate nous permet de suivre l'activité cérébrale en temps réel avec une bonne résolution temporelle (de l'ordre de 10 ms) et une bonne résolution spatiale (100x100 μm^2) en offrant la possibilité d'effectuer de l'imagerie éveillée pendant une tâche cognitive. Nous avons vu (3.1.3) que les champs oculomoteurs supplémentaires jouent un rôle fondamental dans la supervision des mouvements des yeux pendant un effort cognitif, et qu'il va être particulièrement intéressant d'imager l'activité du COS pendant une tâche afin de mieux comprendre les mécanismes de contrôle appliqués par celui-ci. Nous savons également (3.1.5) que la

pupille est aussi un marqueur direct de l'effort cognitif, il est donc pertinent d'effectuer une comparaison entre l'activité pupillaire et l'activité du COS pendant une tâche.

Par ailleurs, notre plan d'imagerie contient aussi une portion du cortex cingulaire antérieur dorsal, lié au suivi de l'effort et à l'engagement dans une tâche cognitive (3.1.4). Nous expliciterons, dans une seconde partie, le rôle du CCAd dans la volition chez le primate non-humain avec notamment la notion de reprise volontaire d'une tâche après une pause.

3.2. Matériel et Méthodes

Modèle animal et données comportementales

Toutes les expérimentations ont été conduites avec l'accord du Ministère de l'Éducation, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, sous le numéro de projet APAFIS #6355-201608091106046. Les données fonctionnelles ont été acquises sur deux macaques rhésus mâles (*macaca mulatta*) nés et élevés en captivité, âgés de 21 ans et 10 ans et pesant respectivement 10 kg et 16 kg 500. Les deux macaques rhésus sont entraînés à réaliser des tâches visuelles oculomotrices de saccades et d'antisaccades. En ce qui concerne la tâche de saccade, les animaux doivent fixer leur regard sur un rectangle vertical situé à gauche ou à droite de l'écran. Pour la tâche d'antisaccade, les animaux doivent porter leur regard du côté contraire à la présentation d'un rectangle horizontal. Chaque animal commence la tâche par une ligne de base (d'une durée aléatoire de 200 à 220 secondes) pendant laquelle un simple écran gris (couleur hexadécimale : #FF3F3F3F) est suivi de saccades et d'antisaccades (ordre aléatoire) pendant 1 heure. Pendant l'acquisition des données expérimentales, la position oculaire de chaque primate est enregistrée à l'aide d'un logiciel vidéo de suivi oculaire (EyeLink 1K, SR-Research) permettant le suivi en temps-réel du paradigme expérimental et la délivrance d'une récompense (ou non) basé sur le succès (ou l'échec) de la tâche oculomotrice.

Dispositif expérimental

Les données ont été enregistrées chez 2 macaques rhésus (*macaca mulatta*). Le nombre de sessions pour chaque animal est respectivement de 28 pour le singe S. et de 19 pour le singe G., soit un total de 47 sessions, pour la tâche de saccades et d'antisaccades. Deux types de tâche de saccade/antisaccades ont été enregistrés chez les deux singes. La première consiste en une tâche de saccade/antisaccade avec un taux de récompense constant et consistant en un point de fixation bleu déclenchant, si la fixation est réalisée, la présentation de l'indice nécessaire à la réalisation de la saccade. La seconde tâche consiste en une modulation de la récompense : la récompense de base est gardée constante et le point de fixation varie en 3 couleurs. Un point de fixation rouge signifie une demi-récompense, un point bleu une récompense de base, un point vert, une récompense et demie. Une fois la fixation effectuée, l'indice pour réaliser la

saccade/antisaccade est présenté, et, en cas de succès, est délivrée la récompense. Durant les expérimentations, les données comportementales telles que la position des yeux et du diamètre de la pupille sont enregistrées à l'aide d'un logiciel de suivi vidéo EyeLink et l'activité vasculaire cérébrale enregistrée à l'aide d'un échographe fonctionnel ultrasonore. Les tâches comportementales sont codées et gérées par un ordinateur dédié à l'aide du logiciel EventIDE (OkazoLab, Pays-bas).

Implantation du poste de tête et enregistrements ultrasonores chez le singe éveillé

Les deux singes ont été implantés avec un poste de fixation de tête en titane par procédure chirurgicale aseptique (Crist Instrument, MD, USA). Après entraînement comportemental des singes, une chambre d'enregistrement pour électrophysiologie de 19 mm de diamètre a été implantée et une craniotomie effectuée au même endroit (CILUX chamber, Crist Instrument, MD, USA, position : médiolatéral +0mm, antéropostérieur + 26 mm). Une sonde ultrasonore (128 éléments, 15 MHz, 100 x 100 μm^2 de résolution spatiale) est positionnée dans la chambre d'enregistrement préalablement remplie de gel échographique stérile.

Enregistrement fonctionnel ultrasonore

Les variations de volume sanguin cérébral (CBV pour *Cerebral Blood Volume*) ont été enregistrées en temps réel à l'aide d'un prototype d'échographe fonctionnel (Iconeus, Paris, France et Inserm U1273) relié à une sonde échographique linéaire de fréquence centrale $f_c = 15$ MHz. Une séquence standard d'imagerie se déroule de la manière suivante : le cerveau est insonifié par 11 ondes planes ultrasonores successives d'angles variant entre -10° et 10° par pas de 2° avec une fréquence de répétition d'onde de 5,5 kHz. Les échos rétrodiffusés sont ensuite enregistrés sur la même barrette ultrasonore et traités afin de former un bloc de 200 images consécutives à la fréquence de 500 images par seconde (soit 400 ms par bloc de 200 images). Pour isoler le signal provenant des vaisseaux et le signal provenant du tissu, un filtrage par décomposition en valeur singulière (1.4.5.2) est appliqué au bloc de 200 images en retirant les 30 premiers vecteurs singuliers correspondant au signal issu des tissus. Finalement, une image en Doppler de puissance est obtenue toute les 400 millisecondes par intégration de l'énergie des images Doppler.

Enregistrement des mouvements oculaires

Pendant les tâches, les mouvements des yeux et le diamètre pupillaire ont été enregistrés à l'aide d'un logiciel vidéo de suivi oculaire. (Eyelink 1K, SR-Research) connecté à un convertisseur analogique-digital (Plexon Inc, TX, USA). Toutes les données sont centralisées sous le logiciel Plexon et analysées sous Matlab (The MathWorks Inc., Massachusetts, USA).

Analyse des données

Modèle Linéaire Généralisé

Les données Doppler ont été analysées à l'aide du modèle linéaire généralisé implémenté sous Matlab. La matrice d'expérience consiste à prendre la valeur du diamètre pupillaire au cours du temps après la réalisation de la saccade et de l'antisaccade (0,6 seconde après la présentation pour le singe G, 0,8 secondes après la présentation pour le singe S.) afin d'obtenir une carte en Z-score et en p -value. Les cartes d'activations montrent le Z-score tel que la valeur du pixel activé aie $p < 0,05$ (avant la correction de Bonferroni). La région d'intérêt (ROI) a été choisie dans le COS à l'aide des cartes d'activations et de l'atlas Paxinos pour le cerveau du macaque rhésus. Le signal est moyenné dans les deux dimensions spatiales afin d'obtenir un signal temporel exprimé en augmentation relative par rapport à la ligne de base du volume sanguin cérébral (rVSC) en soustrayant la moyenne de la ligne de base et en divisant par cette même moyenne.

Extraction du diamètre pupillaire

Le diamètre de la pupille est exprimé en augmentation relative par rapport à la ligne de base du diamètre pupillaire en soustrayant et divisant par la valeur du diamètre pupillaire pendant la ligne de base (d'où nous excluons les clignements et les moments où les yeux sont fermés). Après l'expression du diamètre pupillaire en pourcentage et afin d'obtenir celui pendant une tâche, nous réalignons le signal de la pupille sur la présentation de l'objet. Une fois l'alignement effectué, nous nous plaçons sur le premier maximum local de la dilatation pupillaire (soit 0,6 seconde pour le singe G, et 0,8 seconde pour le singe S) pour extraire le diamètre du $i^{\text{ème}}$ essai.

Réponse hémodynamique

La réponse hémodynamique est déterminée en moyennant toutes les réponses vasculaires aux saccades et antisaccades individuelles sur une séance complète. Une fois la moyenne de la réponse vasculaire individuelle obtenue, nous appliquons un algorithme d'ajustement d'une fonction de densité de probabilité d'une loi gamma-inverse (*lsqcurvefit*, Optimization Toolbox, Matlab) comme effectué dans une autre étude^{42,43}.

Réponse pupillaire à la lumière

La réponse pupillaire à la lumière (RPL ou PRL pour *Pupillary Light Response*) a été déterminé en moyennant la réponse de la pupille à un court flash blanc de 200ms (#FFFFFF) suivant une fixation (250 ms) sur un écran noir (#000000) et suivi d'un écran noir (4 secondes) faisant office d'attente entre les essais afin de s'assurer que la pupille retourne à un état basal avant l'enchaînement fixation/flash suivant.

Analyse statistique des réponses évoquées

L'analyse statistique entre deux groupes, de par la non-normalité de nos valeurs, est effectuée à l'aide du test du rang de Wilcoxon (*ranksum* sous Matlab). L'hypothèse nulle H_0 étant la non-différence statistique entre nos deux groupes.

Quand un seul groupe était disponible (par exemple pour vérifier la non-nullité des valeurs du diamètre pupillaire), un test T de Student est effectué (*ttest* sous Matlab). Quand aucune distinction explicite n'est mentionnée, les valeurs en provenance des deux singes sont réunies sans distinction.

Lorsque plusieurs groupes devaient être comparés, nous avons effectué une analyse par modèle linéaire mixte, en vérifiant l'homogénéité des variances grâce au test de Barlett. Si besoin était, en les homogénéisant par une transformation racine carrée ($\text{sign}(x) \cdot \sqrt{\text{abs}(x)}$). La normalité des résidus est effectuée grâce au test de Shapiro-Wilk.

3.3. L'activité des champs oculomoteurs supplémentaires est un reflet de l'effort cognitif

3.3.1. Introduction

Quelques études pionnières ont montré que la dilatation pupillaire varie avec une augmentation de la demande cognitive de la tâche, incluant la perception, l'attention, l'apprentissage et la mémoire^{9,41,44-47}. Deux interprétations majeures pour ces résultats ont été proposés : tandis que certains auteurs ont conclu que la dilatation de la pupille reflète la demande cognitive de la tâche, d'autres soutiennent que la dilatation pupillaire est un reflet de l'effort exercé en réponse à la demande cognitive^{9,41,48}. Si les mécanismes neuronaux par lesquels ces processus cognitifs impliquent la pupille restent flous, le cortex préfrontal dorsomédian (CPFdm), impliqué dans les processus de stimulation, joue probablement un rôle.

Le cortex préfrontal dorsomédian contient les aires pré-motrices supplémentaires (pre-AMS), l'aire motrice supplémentaire (AMS) et les champs oculomoteurs supplémentaires (COS). Si les champs oculomoteurs frontaux sont connus pour être impliqués dans le contrôle des mouvements oculaires et de l'attention visuelle, de récentes études ont montré que l'amplitude de la réponse pupillaire est liée non seulement à un stimulus lumineux mais aussi au COF, des microstimulations électriques de ce dernier modifiant la réponse pupillaire^{49,50}. Fortement lié au COF et à l'CCA, le COS est une région clef de l'intégration des tâches oculomotrices liée à l'attention et à la mémoire ; il projette non seulement directement des connexions dans le noyau oculomoteur du colliculus supérieur mais pourrait, comme le COF et l'CCA, jouer directement sur la réponse pupillaire à la lumière en projetant des connexions dans le noyau olivaire du pretectum. Si le rôle du COS est clairement défini dans la littérature quant aux tâches oculomotrices, les relations entre les dynamiques de la pupille et l'activité du COS sont encore inconnues.

Durant des tâches impliquant des mouvements oculaires, les dynamiques pupillaires ont été étudiées pendant la préparation et avant l'exécution de mouvements des yeux⁵¹, suggérant une implication dans le reflet de processus corticaux sous-jacents. Dans le cadre d'une tâche de saccade/antisaccade, les sujets doivent regarder automatiquement un indice donnant l'injonction de réaliser une saccade, ou, dans le cadre d'une antisaccade, inhiber ce réflexe pour regarder dans la direction opposée au stimulus

(antisaccade). Durant ce type de paradigme, le diamètre de la pupille est plus grand lorsque que le sujet va réaliser une antisaccade correcte par rapport aux prosaccades correctes et aux antisaccades erronées (qui sont, de fait, des prosaccades)⁵². Le COS jouant un rôle critique dans la production d'antisaccades (par inhibition de la saccade réflexe en premier lieu)¹⁹, il est intéressant d'étudier le lien entre la dynamique du COS et celle de la pupille.

Grâce aux ultrasons fonctionnels, permettant une imagerie avec une haute résolution temporelle et spatiale (de l'ordre de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$) sur des animaux réalisant une tâche comportementale^{53,54}, nous avons testé les liens entre la pupille et l'activité du COS à court et long terme. Notre étude montre deux résultats principaux : (1) L'activité du COS est un bon prédicteur de l'activité pupillaire à court et long terme et (2) en manipulant la récompense et, de fait, l'effort cognitif à effectuer pour une tâche donnée, nous montrons des covariations fortes entre le diamètre de la pupille et l'activité vasculaire dans le COS.

3.3.2. Résultats

L'activité vasculaire des champs oculomoteurs supplémentaires a été enregistrée chez 2 macaques rhésus (Singe S, 21 ans, 10 kg et Singe G, 10 ans, 16,5 kg) sur $N_S = 28$ sessions pour le singe S et $N_G = 21$ sessions pour le singe G. Les deux singes sont entraînés à effectuer une tâche oculomotrice de prosaccades et d'antisaccades (Figure 63)

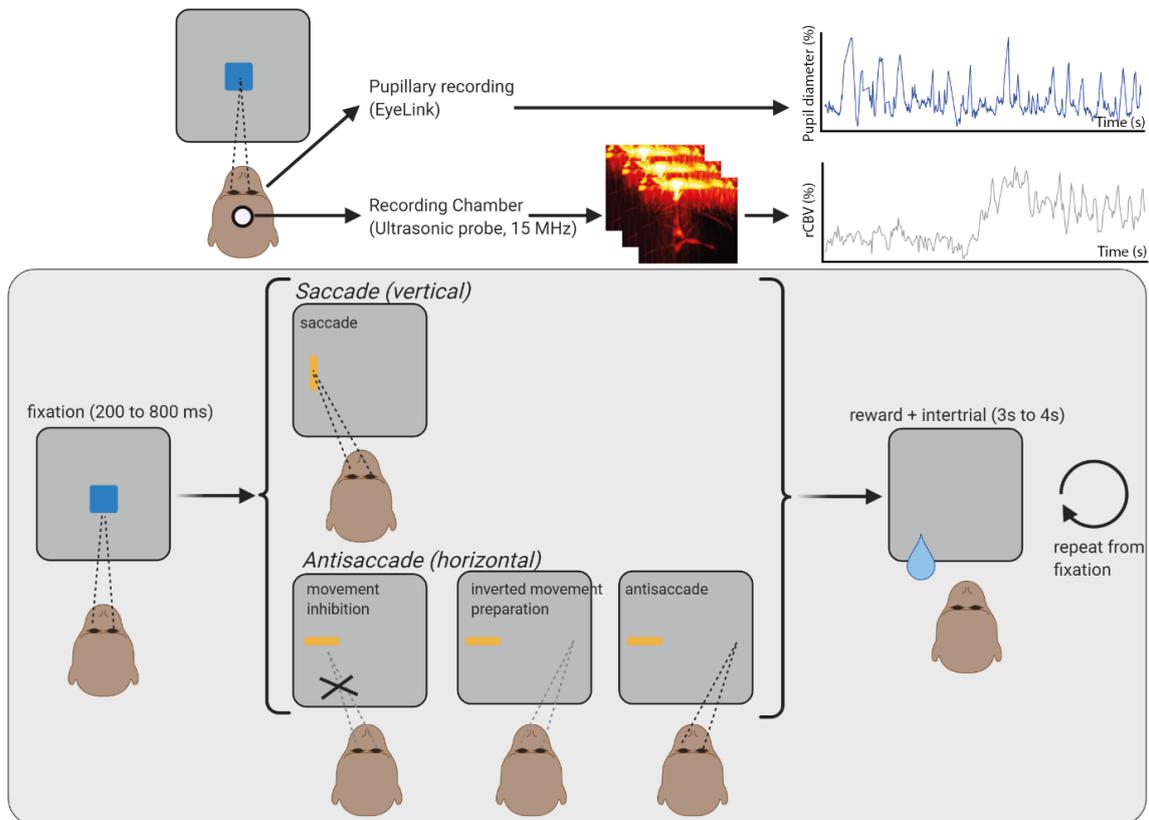


Figure 63. Déroulement d'une session d'imagerie. Le singe est fixé au niveau de la tête dans une chaise de contention avec une sonde ultrasonore ($f_c = 15$ MHz) dans la chambre d'enregistrement. Un système vidéo de suivi oculaire (EyeLink 1K) permet le suivi et l'enregistrement en temps réel de la position des yeux et du diamètre pupillaire. La tâche commence par une ligne de base d'une durée aléatoire comprise entre 200 et 220 secondes, suivie par un point de fixation. Si l'animal fixe correctement l'indice proposé, une prosaccade (rectangle vertical) ou une antisaccade (rectangle horizontal) est proposée à l'écran. En fonction de la réussite (ou non) de la saccade demandée, l'animal reçoit une récompense hydrique sous la forme d'eau sucrée, la quantité étant directement dépendante de la couleur du point de fixation (rouge : 0,5x récompense normale, bleu : 1x récompense, vert : 1,5x récompense normale). S'ensuit un écran gris entre les essais (3 à 4 secondes, durée randomisée) avant de reprendre à la fixation initiale.

Les deux singes montrent un temps de réaction plus faible pour les prosaccades par rapport aux antisaccades (Singe S : 183 ± 18 ms pour les prosaccades, contre 250 ± 13 ms pour les antisaccades, $p = 3e-9$; Singe G : 201 ± 28 ms pour les prosaccades, contre 255 ± 15 ms pour les antisaccades, $p = 6e-5$. Les p -valeurs ont été obtenues à l'aide du test du rang de Wilcoxon). Les deux singes présentent un taux de réussite de l'ordre de 85% (Singe S : $88,3 \pm 4,2\%$; Singe G : $85,7 \pm 4,8\%$), ce qui est un taux de réussite correct pour une tâche de pro/antisaccades aléatoires. (Figure 64)

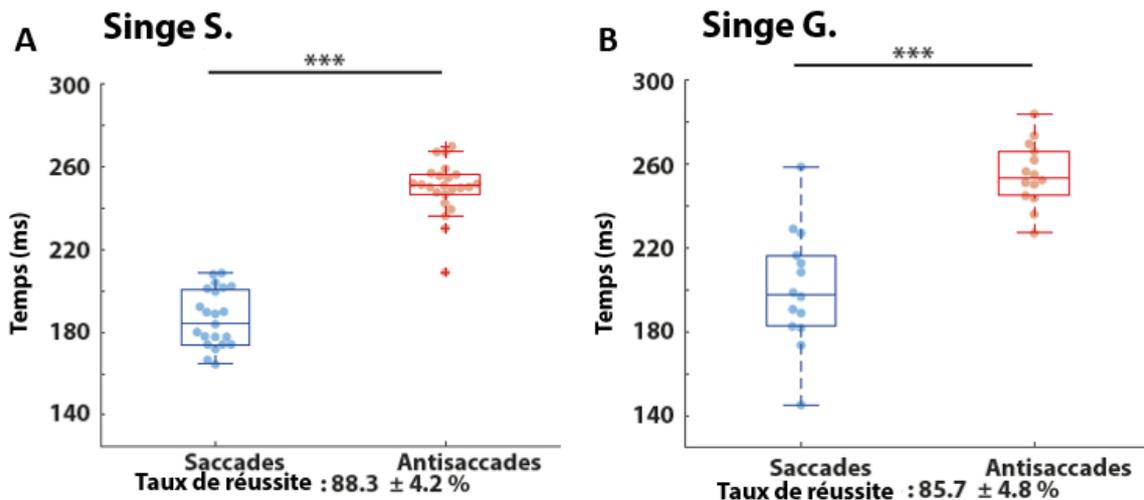


Figure 64. Latences des prosaccades (bleu) et antisaccades (rouge) pour les singes S (A) et G (B). (A) Le singe S présente un temps de saccade de 183 ± 18 ms, un temps d'antisaccade de 250 ± 13 ms. Les deux grandeurs sont statistiquement différentes ($p = 3e-9$, test de Wilcoxon). (B) De même, le singe G présente un temps de saccade de 201 ± 28 ms et un temps d'antisaccade de 255 ± 15 ms ($p = 6e-5$, test de Wilcoxon).

3.3.2.1. Le choix de la zone fonctionnelle est effectué sans a priori.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la relation entre le diamètre de la pupille et l'activité neurovasculaire dans le cerveau, en cherchant à éviter les *a priori* anatomiques concernant la zone activée. Pour ce faire, nous avons appliqué le modèle linéaire généralisé en utilisant le diamètre de la pupille, connu pour être un reflet de la charge cognitive⁹, en tant que matrice d'expérience de notre modèle.

La construction de la matrice d'expérience est réalisée de la manière suivante : les traces pupillaires sont réalignées sur la présentation de l'indice indiquant une prosaccade

ou une antisaccade et nous prenons la valeur de la pupille au moment du premier maximum local, à 0,8 seconde pour le singe S et 0,6 seconde pour le singe G.

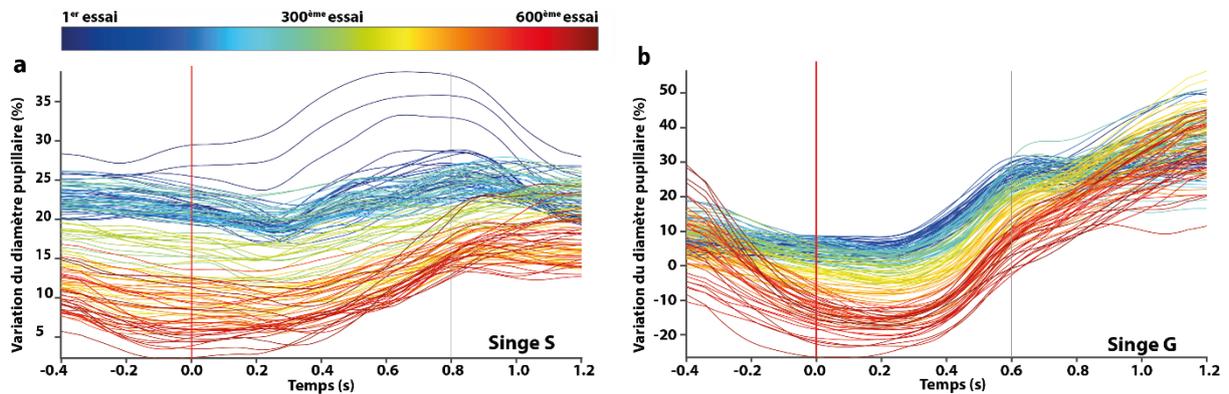


Figure 65. Dilatation de la pupille au cours d'une tâche cognitive chez le primate. La couleur représente le numéro de l'essai (bleu : premiers essais, rouge : derniers essais) et l'abscisse représente le temps depuis la présentation de l'indice conduisant la saccade ou l'antisaccade. (a) Singe S. En s'intéressant au premier maximum local, il faut se situer à $t = 0,8$ seconde après la présentation de l'indice. (b) Singe G, il faut se situer à $t = 0,6$ seconde après la présentation de l'indice pour avoir le premier maximum local de la dilatation de la pupille induite par la tâche cognitive

En effet, le diamètre de la pupille est plus élevé au début d'une séance de travail cognitif (en bleu sur la Figure 65) qu'à la fin (en rouge sur la Figure 65) : afin de pouvoir rendre compte de la diminution du diamètre de la pupille au cours d'une tâche, nous avons choisi de nous positionner au maximum de dilatation après la réalisation de la pro/anti saccade.

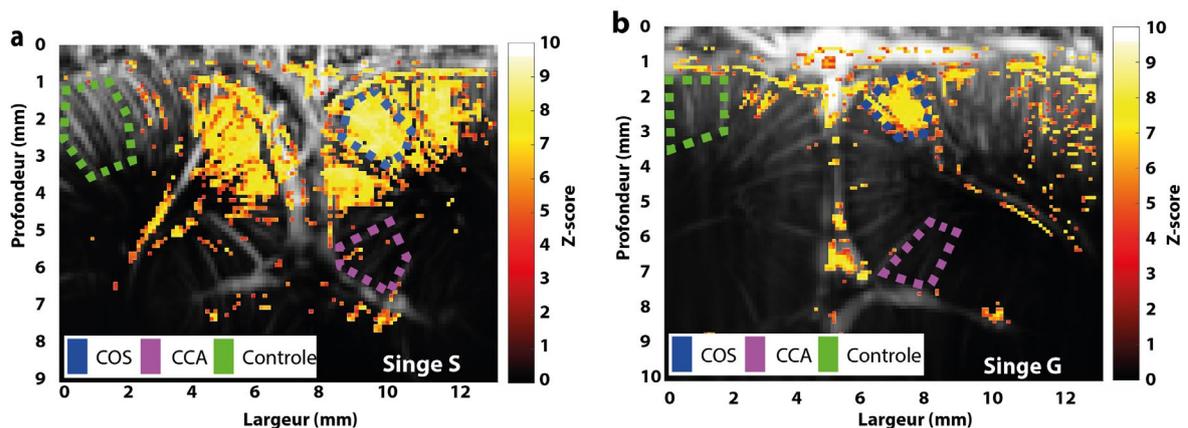


Figure 66. Exemple pour une session d'activation fonctionnelle corticale obtenue avec le modèle linéaire généralisé en utilisant le diamètre pupillaire comme variable d'entrée. (a) Singe S, les activations fonctionnelles se situent majoritairement dans le COS droit et gauche (bleu) alors qu'aucune activation ne semble observée dans le CCA (mauve) ni dans la zone contrôle (vert). (b) Même chose pour le singe G. COS : champ oculomoteur supplémentaire ; CCA : Cortex cingulaire antérieur ; Control : Contrôle.

Une fois le MLG appliqué à nos données, la zone fonctionnellement activée est comparée avec l'atlas Paxinos et nos données suggèrent que le COS est fortement corrélé avec l'activité pupillaire au cours de notre tâche cognitive (Figure 66). Finalement, l'extraction du signal Doppler en volume sanguin cérébral relatif (VSCr) est effectuée en moyennant spatialement le signal Doppler dans la zone activée et en soustrayant et divisant par la valeur du signal Doppler pendant la ligne de base (Figure 67).

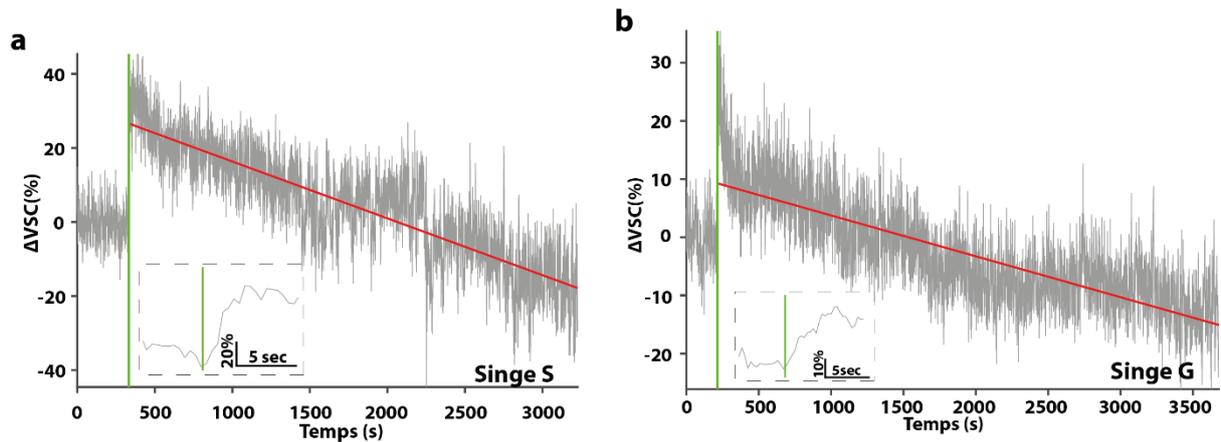


Figure 67. Décours temporel du VSC dans le COS au cours du temps. (a) Chez le singe S, nous observons, après une augmentation du signal tel que décrit chez Dizeux et al.⁵³, une pente indiquant une diminution de notre signal au cours du temps. La barre rouge verticale indique la fin de la ligne de base et le début de la tâche. En encadré, un zoom sur le début de la tâche et la fin de la ligne de base montrant la forte augmentation de VSC au début d'une tâche. (b) idem pour le singe G

3.3.2.2. Variations sur le long terme du volume sanguin cérébral dans les champs oculomoteurs supplémentaires et du diamètre pupillaire

Nous désirons maintenant étudier le lien fort entre le COS et le diamètre de la pupille au court d'une tâche cognitive, en plus du lien fonctionnel qui semble exister, mis en exergue par le MLG, en nous intéressant aux variations au très long terme entre le COS et la pupille

Pendant une tâche de prosaccade et d'antisaccade à récompense constante, nous avons observé une diminution du VSCr forte et reproductible à travers toutes les séances dans les COS (-23 ± 2 %/hr pour le singe S et -21 ± 5 %/hr pour le singe G) après l'augmentation initiale du volume sanguin telle que décrite par Dizeux *et al* en 2019⁵³.

(voir Figure 67) De la même manière, nous observons une diminution forte et reproductible dans le diamètre de la pupille au cours du temps ($9,3 \pm 0,3 \%$ pour le singe S et $-9,7 \pm 3,1 \%$ pour le singe G), Figure 68.

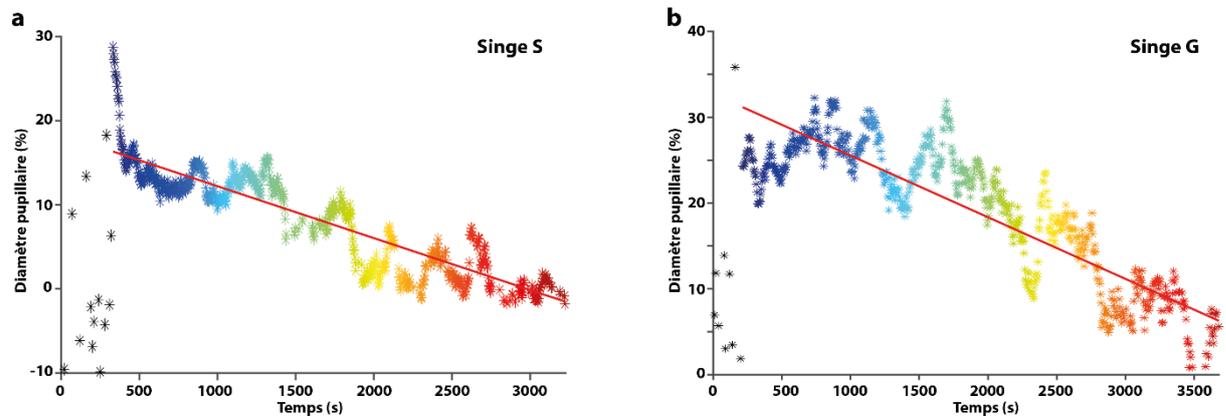


Figure 68. Diminution du diamètre de la pupille au cours du temps lors d’une tâche cognitive. (a) Singe S, les points colorés ont le même code couleur que la Figure 65, les points noirs correspondent au diamètre de la pupille pendant la ligne de base. La ligne bleue au-dessus des points colorés représente l’ajustement d’une droite sur les données pupillaires pour déterminer le taux de décroissance. (b) même chose pour le singe G.

Nous nous sommes ensuite intéressés au lien entre la pupille et d’autres aires corticales, notamment le CCAd, situé dans notre plan d’imagerie. L’étude du carré du coefficient de corrélation de Pearson (r^2) entre la pupille et 3 zones corticales (COS, CCAd et une aire contrôle choisie le plus loin possible du COS), en utilisant le modèle linéaire mixte (les 2 animaux sont réunis et on tient compte d’un effet fixe : la zone, et de deux effets aléatoires : le singe et le jour de l’acquisition), montre que le r^2 est significativement plus important dans le COS ($r^2 = 0,26 \pm 0,03$) que dans le CCAd ($r^2 = 0,08 \pm 0,01$, $p < 0,001$) et dans la zone contrôle ($r^2 = 0,08 \pm 0,02$, $p < 0,001$). Entre la zone contrôle et l’CCAd, aucune différence significative n’a été mesurée ($p > 0,05$).

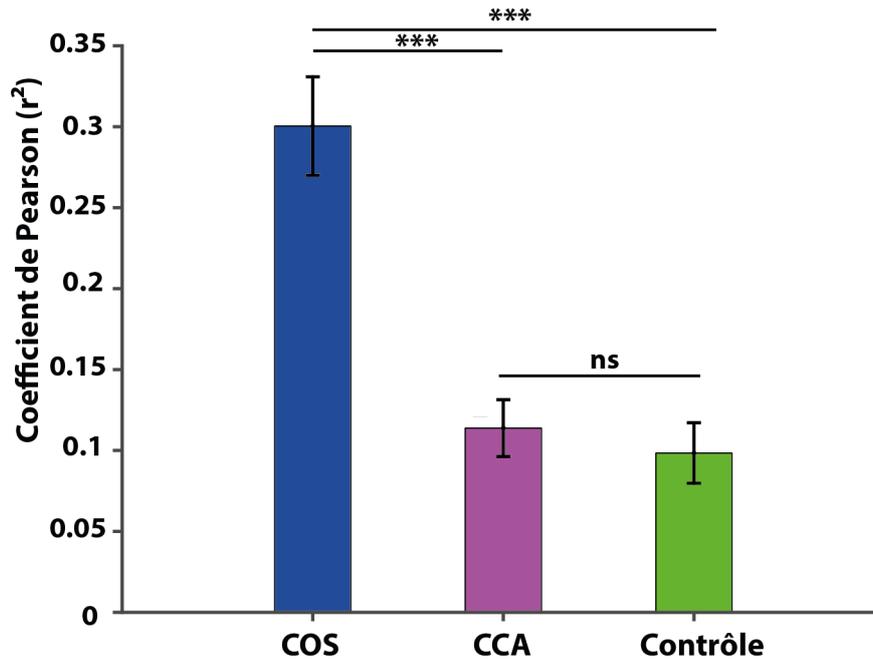


Figure 69. Coefficient de corrélation r^2 entre l'activité pupillaire et l'activité vasculaire de 3 zones corticales. *** $p < 0,001$, ns : non significatif. COS : Champ oculomoteur supplémentaire, CCA : Cortex cingulaire antérieur

De telles corrélations entre l'activité d'une zone corticale du cortex préfrontal et une activité du système nerveux autonome n'ont, à notre connaissance, jamais été mises en évidence.

3.3.2.3. Caractérisation temporelle de la réponse vasculaire du COS et de l'activité pupillaire.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la caractérisation temporelle de la réponse pupillaire et de la réponse vasculaire dans les champs oculomoteurs supplémentaires, afin de déterminer si les réponses sont simultanées, et dérivent du même processus neuronal, ou si l'un précède l'autre, auquel cas les processus neuronaux mis en jeu pourraient comporter une ou plusieurs étapes supplémentaires.

Pour commencer, il nous faut déterminer la fonction de réponse hémodynamique (FRH) pour chacun de nos singes et pour l'imagerie ultrasonore. Pour réaliser la détermination expérimentale de la FRH, nous moyennons l'activité dans le COS durant

notre tâche, le tout étant recalé sur la présentation de la cible de saccade, avant d'ajuster une fonction de densité de probabilité gamma-inverse (comme nous l'avons déjà effectué en 2.4.3.1) pour les sessions sur lesquelles nous avons déterminé notre fonction de réponse hémodynamique ($n = 9$ sessions pour le singe S et $n = 7$ sessions pour le singe G). A la suite de l'ajustement de la fonction gamma inverse, nous avons obtenus les paramètres de notre fonction, dont les valeurs individuelles sont représentées en Figure 70 pour le singe S et G.

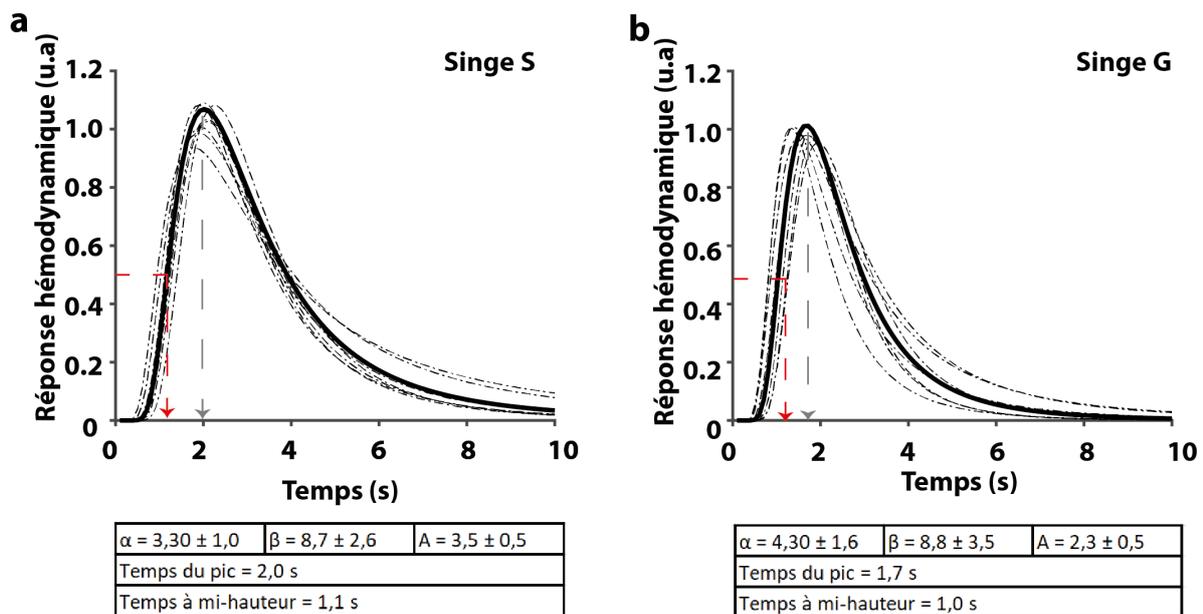


Figure 70. Fonction de réponse hémodynamique déterminée expérimentalement. (a) Singe S. La fonction de réponse hémodynamique moyenne présente son maximum à 2,0 secondes. Le trait noir plein représente la moyenne des sessions tandis que les traits gris en pointillés représentent les sessions individuelles. Le tableau récapitule les valeurs des FRH pour les réponses moyennes (b) Même chose pour le singe G, la fonction de réponse hémodynamique atteint son maximum à 1,7 seconde.

Il nous semble important de noter que nous observons une **variance interindividuelle dans les réponses hémodynamique**, impliquant qu'il est probablement nécessaire de tenir compte de cette variabilité si l'on désire étudier précisément des phénomènes temporels et que nous ne pouvons probablement pas nous limiter à prendre une FRH moyenne sur plusieurs individus : entre le singe S et le singe G, nous observons une variation de l'ordre de 15% dans le temps de montée jusqu'au pic de la FRH.

Puisque nous cherchons à caractériser une différentes de temporalité entre la pupille et la réponse vasculaire, une fois obtenue la dynamique vasculaire de chacun de nos singes, il nous faut caractériser la dynamique pupillaire.

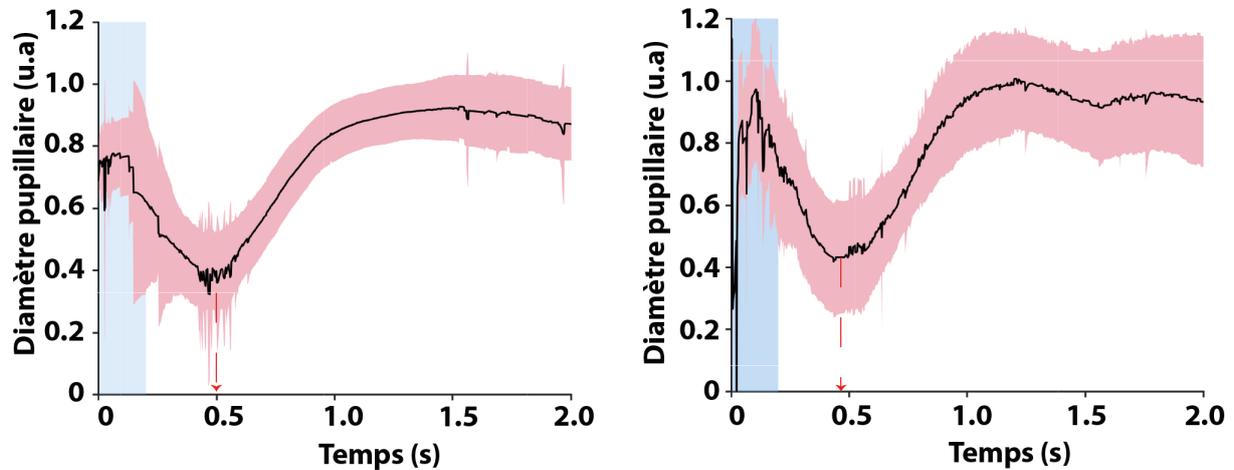


Figure 71. Réponse pupillaire à la lumière (a) Singe S, le trait noir représente la moyenne tandis que l'aire rouge représente la déviation standard autour de la moyenne. L'aire bleue représente le flash lumineux (blanc) induisant la réponse pupillaire à la lumière. La RPL atteint son minimum vers 450 ms. (b) Même chose pour le singe G.

Une expérience type consiste à enregistrer le diamètre pupillaire après un flash lumineux d'une durée typique de 200 ms, nous donnant alors accès à la réponse pupillaire à la lumière (RPL). Dans notre cas, la réponse pupillaire à la lumière est telle que le singe S possède un minimum vers 450 ms et le singe G vers 480 ms. (Figure 71). Nous cherchons ensuite à caractériser le décalage temporel entre l'activité pupillaire et l'activité vasculaire. Puisque l'on ne cherche pas, cette fois, à caractériser une décroissance globale de l'activité pupillaire ou de l'activité vasculaire, nous recalons les données de telle sorte que, à $t=0$, les données coïncident en 0 (Figure 72).

Une fois que nous avons ces activités pupillaires et vasculaires, nous déterminons les temps des pics individuels auxquels nous retranchons, pour l'activité pupillaire, la valeur temporelle minimum de la réponse pupillaire à la lumière et pour la réponse vasculaire, la valeur temporelle maximale du pic de la FRH. Nous obtenons alors une représentation en histogramme des valeurs de décalage temporel entre la réponse pupillaire et la réponse vasculaire

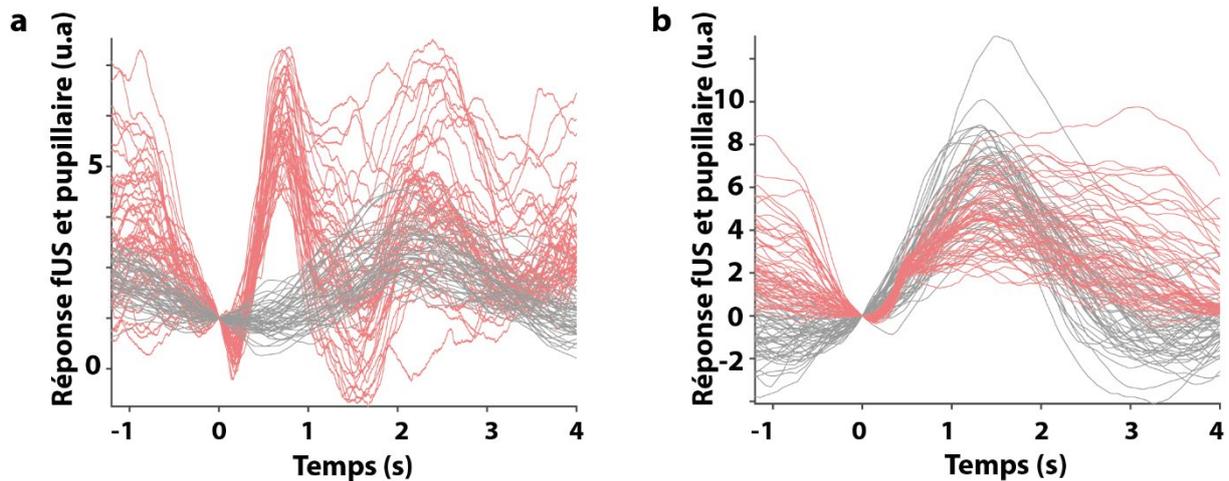


Figure 72. Superposition temporelle de l'activité pupillaire (en rose) et de l'activité vasculaire (en gris) Contrairement aux données des figures précédentes, on ne cherche pas à caractériser une diminution temporelle globale, c'est pour cela que toutes les données sont recalées en $t=0$ (a) singe S, (b) Singe G.

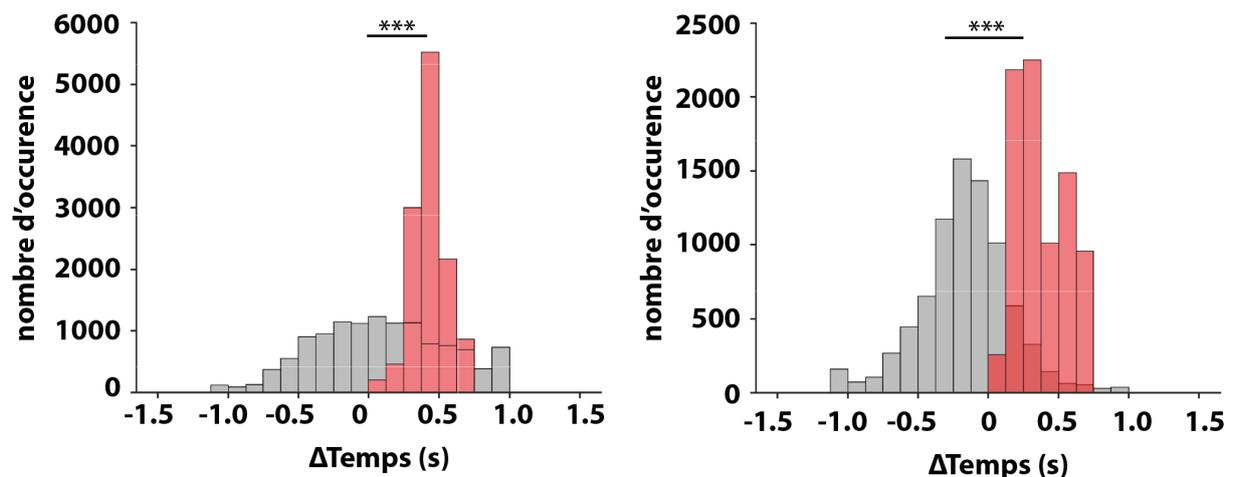


Figure 73. Décalage temporel entre la réponse vasculaire (gris) et la réponse pupillaire (rouge). (a) Singe S, on remarque que l'activité liée à la réponse vasculaire (déconvoluée par la FRH) semble précéder la réponse pupillaire (déconvoluée par la RPL), suggérant que les processus commandant la réponse du COS précèdent celle de la pupille ($p < 0,001$, Test du rang de Wilcoxon). (b) même chose pour le singe G.

Nous observons que l'activité liée à la réponse vasculaire semble précéder la réponse pupillaire, nous permettant de suggérer que la réponse du COS

précède la réponse autonome de la pupille et que les deux évènements ne se passent pas au même moment au sein du cerveau.

Enfin, une dernière partie de cette étude porte sur la manipulation de l'activité du COS et de la pupille, afin de déterminer le lien entre les deux. Pour ce faire, nous avons manipulé la récompense reçue par les 2 singes au cours de la tâche et regardé les effets de cette manipulation sur l'activité vasculaire au sein du COS et de l'activité pupillaire.

3.3.2.4. L'amplitude de la récompense manipule directement l'activité des champs oculomoteurs supplémentaires et le diamètre de la pupille.

Afin de mesurer et de caractériser le lien entre la pupille et l'activité vasculaire du COS, nous avons légèrement modifié notre paradigme de pro/anti saccades en ajoutant un code couleur sur le point de fixation précédant la saccade. Le code couleur sur le point de fixation, défini par blocs de 100 essais, est un indice donné sur l'amplitude de la récompense qui va advenir après la réalisation correcte de la saccade, 0,5 unité de récompense pour un point de fixation rouge, 1 unité de récompense pour un point de fixation bleu et 1,5 unité de récompense pour un point de fixation vert.

Durant cette nouvelle tâche, nous avons observé des variations du ΔVSC lors de la transition d'une valeur de récompense à une autre, ainsi que pour le diamètre de la pupille (Figure 74).

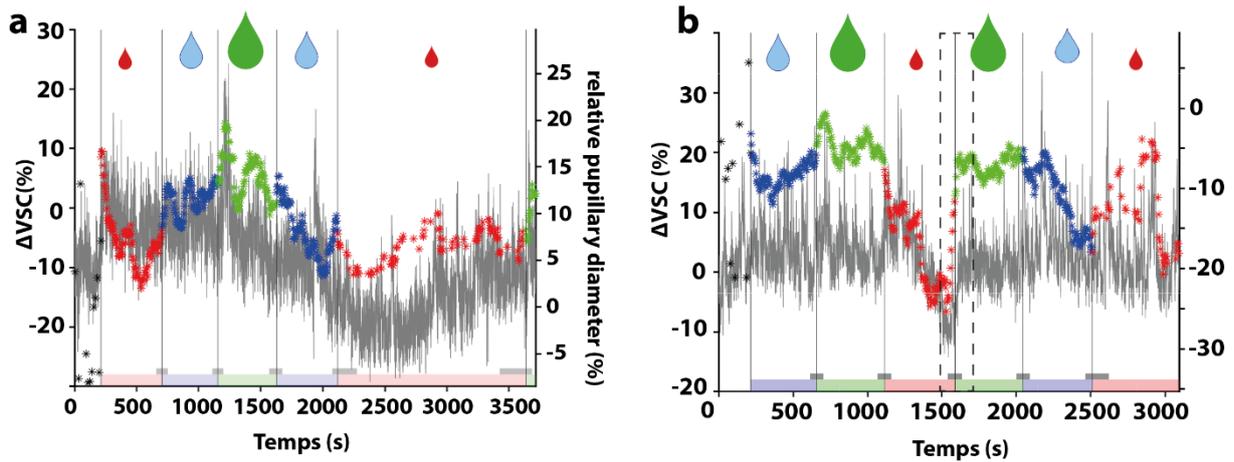


Figure 74. Exemple d'une session de modulation de la récompense pendant une tâche et manipulation du VSC et du diamètre pupillaire (a) Singe S, Les couleurs représentent la quantité de récompense obtenue à la fin de chaque essai réussi (rouge : 0,5 unité, bleu : 1 unité, vert : 1,5 unité). Le ΔVSC est représenté en gris, le diamètre pupillaire en couleur. (b) même chose pour le singe G.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux transitions de récompense pour investiguer si un changement de cette dernière induit des changements dans le comportement du singe ainsi que dans ses grandeurs comportementales comme le ΔVSC et le diamètre pupillaire relatif. Pour calculer ces transitions de récompenses, nous prenons les 10 essais avant et après un changement dans la valeur de la récompense et nous moyennons la valeur du diamètre de la pupille et la valeur du ΔVSC (Figure 75)

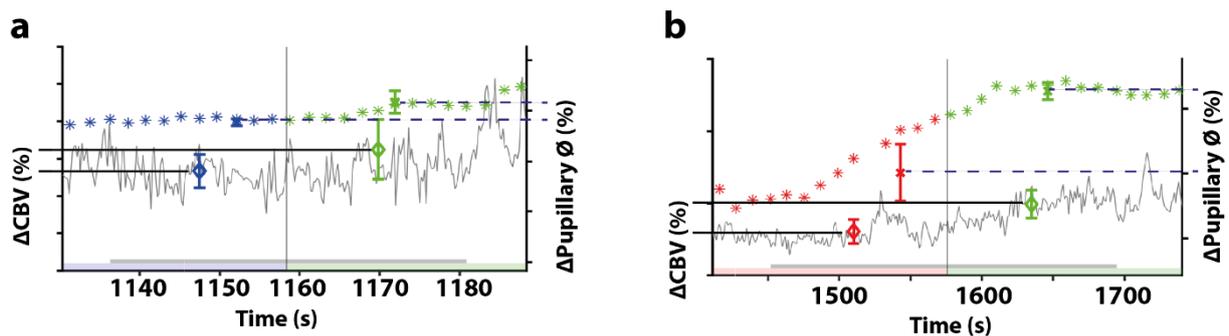


Figure 75. Méthode de calcul de la variation de ΔVSC et du diamètre pupillaire au moment d'une transition de récompense pendant la tâche de modulation de récompense. (a) Singe S, les diamants représentent la valeur moyenne du VSC sur les 10 essais avant/après la transition tandis que les étoiles représentent le diamètre de la pupille (b) même chose pour le singe G

Nous obtenons finalement les valeurs pour les 2 singes pour chaque transition (-67% pour la transition vert → rouge, -50% pour la transition bleu → rouge, -34% pour la transition vert → bleu, +50% pour la transition bleu → vert, +100% pour la transition rouge → bleu et finalement +200% pour la transition rouge → vert) et nous observons, dans le cas d'une transition à la baisse, une diminution du diamètre de la pupille (-67% : $-1,89 \pm 0,84$; -50% : $-2,82 \pm 2,02$ % ; -34% : $-1,42 \pm 0,93$ %) (Figure 76.a) mais nous ne semblons pas mesurer de diminution significative du volume sanguin cérébral dans les zones choisies (COS, CCA et contrôle, Figure 76.b).

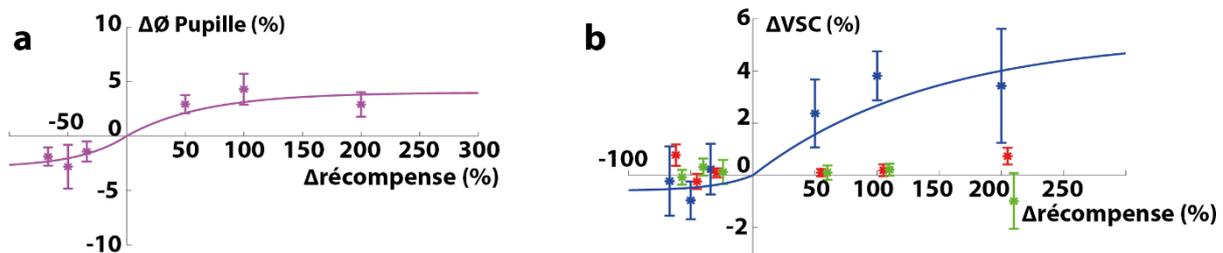


Figure 76. Effet de la modulation des valeurs de récompenses sur le diamètre de la pupille et différentes aires corticales. (a) Modulation du diamètre pupillaire en fonction de la récompense pour les transitions positives et négatives. Une fonction exponentielle est ajustée par morceaux aux données (négatif et positif). (b) Modulation de la valeur du volume sanguin cérébral, une fonction exponentielle est ajustée par morceaux (négatif et positif) aux données du COS. bleu : COS, rouge : CCAd, vert : zone contrôle.

Au contraire, lors d'une transition d'une récompense faible vers une récompense de plus grande valeur, nous observons une augmentation du diamètre pupillaire (Figure 76.a) (+50% : $2,93 \pm 0,84$ % ; +100% : $4,20 \pm 1,27$ % ; +200% : $2,90 \pm 1,13$ %) de plus en plus importante si la transition de récompense est de plus en plus grande. Similairement, nous observons ce même comportement dans le Δ VSC pour les COS (+50% : $2,37 \pm 1,30$ % ; +100% : $3,38 \pm 0,96$ % et +200% : $3,34 \pm 2,19$ %) mais cet effet ne semble pas présent dans le CCAd et l'aire contrôle. Nous notons qu'il semble y avoir un effet plateau, et que l'augmentation de la récompense ne semble pas pouvoir induire indéfiniment une augmentation du volume sanguin cérébral ou de dilatation de la pupille. Cet effet plateau peut être dû à une saturation de la perception de la récompense.

De façon intéressante, nous observons un effet marginal dans le CCAd (Figure 76.b, rouge) pour les transitions de récompenses les plus abruptes tant dans la diminution de la récompense (vert → rouge : $0,79 \pm 0,41$ %) que dans son augmentation (rouge →

vert : $0,73 \pm 0,32$ %), suggérant un possible effet du CCAd dans l'intégration de la récompense.

Cependant, dû à notre relativement faible épaisseur d'imagerie (400 μ m) et à notre positionnement au-dessus du COS, des investigations plus rostrales du CCAd semblent nécessaires pour mesurer de tels effets dans cette aire.

Finalement, l'activité neurovasculaire dans les COS est fortement modulée en temps réel par la récompense, tout comme la pupille, nous permettant de proposer que les COS jouent un rôle pivot dans le reflet des efforts cognitifs dans le cadre de tâches oculomotrices.

3.3.3. Discussion et conclusion

Nos résultats montrent que les champs oculomoteurs supplémentaires sont des prédicteurs robustes des variations particulières de la pupille lors de tâches oculomotrices. De même, l'activité de la pupille nous permet, sans aucun *a priori*, de déterminer que l'activité neurovasculaire se situe dans une partie restreinte du cortex préfrontal dorsomédian, dans laquelle une activité de préparation aux antisaccades est aussi enregistrée : il s'agit des champs oculomoteurs supplémentaires. En manipulant, au cours d'une tâche de pro/antisaccades, la valeur de la récompense, et donc, indirectement, l'effort cognitif à fournir (travailler pour une récompense plus faible signifie devoir fournir plus d'effort pour un résultat équivalent, et inversement), nous montrons qu'il existe de fortes co-variations entre le diamètre de la pupille et le volume sanguin cérébral dans les COS, nous permettant de suggérer que **les COS sont des aires importantes et mésestimées du cortex préfrontal frontomédian des primates dans le suivi et l'implémentations des signaux liés aux efforts cognitifs** observés dans le système nerveux autonome, ici, la pupille.

Ces résultats, la pupille étant fortement étudiée et liée à l'implication dans une tâche^{9,41,44-46}, suggère que la covariation du diamètre pupillaire et du VSC dans les COS peut avoir plusieurs interprétations.

Premièrement, le passage de volonté d'action à action réelle peut avoir une influence « ascendante » sur les décisions pour produire un biais en faveur de l'acceptation de l'effort. Cette vision serait cohérente avec l'opinion largement répandue selon laquelle la force des représentations neuronales pour les différents choix possibles influence directement la décision ; par exemple, il a déjà été montré que renforcer des comportements liés à une récompense à travers des simulations d'évènements à venir est directement lié avec une prise de décisions qui favorisera les comportements ayant un retour sur investissement plus important, voir une augmentation des comportements prosociaux. Compte tenu de cette hypothèse, le signal de stimulation que nous observons dans le COS pourrait soit moduler à la baisse l'encodage de l'effort soit moduler la règle induite par la décision, impliquant qu'un signal de stimulation assez fort pourrait biaiser une décision vers un choix dont l'effort physique demandé serait défavorable. En ce qui concerne les chemins neuronaux pouvant être empruntés, une activité phasique du *locus caeruleus* est connue pour transmettre des informations remontantes vers le cortex cingulaire antérieur à travers des projections ascendantes dans le cortex préfrontal, fournissant une voie plausible pour de telles influences ascendantes. L'étude de l'activité neuronale du système nerveux autonome associé aux signaux de stimulations dans le cortex préfrontal pourrait aider à fournir un mécanisme supplémentaire. En effet les signaux que nous mesurons pourraient biaiser les choix, permettant de signaler que l'organisme est prêt à relever l'effort physique.

Une autre interprétation de cette covariation du diamètre pupillaire avec le signal VSC dans les COS pour ce passage de volonté d'action à action tangible pourrait être, non pas une influence ascendante comme précédemment, mais une influence descendante. Cette dernière pourrait être un simple sous-produit du choix, impliquant une descente de l'information des zones de décisions corticales vers le système de stimulation. Les choix résultats de la décision pourraient être relayés sous la forme d'informations descendante depuis le cortex préfrontal jusqu'au *locus caeruleus* : par exemple, l'activité du cortex cingulaire antérieur a déjà été, par d'autres auteurs, couplés au diamètre pupillaire et la temporalité de la modulation pupillaire peut, parfois, être mesurée dans le CCA avant de pouvoir être mesurée dans le *locus caeruleus*⁵⁵. De même, des expériences de tractographie ont déjà mis en évidence, chez le rongeur et le singe, des projections du cortex préfrontal directes sur le *locus caeruleus*. Des stimulations intracrâniennes du CCA chez l'humain ont montré des modifications des états de stimulations, notamment par l'augmentation du rythme cardiaque couplé avec une anticipation des efforts à réaliser

et une motivation forte à des surmonter. Cette interprétation est fortement liée, bien que non identique, avec une proposition soutenant que le CCA intègre la valeur attendue de quantité de ressources mentales à mobiliser pour réaliser une tâche.

Finalelement, comme montré par d'autres équipes, les neurones des champs oculomoteurs supplémentaires participent à la sélection des mouvements oculomoteurs en présentant la valeur des actions à effectuer par rapport au contexte dans différents comportements oculomoteurs⁷, cependant, les COS n'ont pas la capacité d'eux même choisir directement les mouvements à effectuer. De même, ils ne participent pas au contrôle rapide et inhibiteur dans le cadre de changement dans les règles de la tâche, mais semblent jouer un rôle dans la régulation au long-terme de l'excitabilité oculomotrice pour ajuster la vitesse et la précision des mouvements. **Nos résultats confortent ces précédents résultats et permet de conclure que, dans le cortex frontomédian des primates, les COS pourraient aussi jouer un rôle pivot dans l'implémentation des efforts cognitifs, observés dans le système nerveux autonome.**

3.4. Bibliographie du chapitre

1. Pouget, P. *et al.* Visual and motor connectivity and the distribution of calcium-binding proteins in macaque frontal eye field: implications for saccade target selection. *Front. Neuroanat.* **3**, (2009).
2. Lowe, K. A. & Schall, J. D. Functional Categories of Visuomotor Neurons in Macaque Frontal Eye Field. *eNeuro* **5**, (2018).
3. Bruce, C. J. & Goldberg, M. E. Primate frontal eye fields. I. Single neurons discharging before saccades. *J. Neurophysiol.* **53**, 603–635 (1985).
4. Schall, J. D. Neuronal activity related to visually guided saccades in the frontal eye fields of rhesus monkeys: comparison with supplementary eye fields. *J. Neurophysiol.* **66**, 559–579 (1991).
5. Schall, J. Visuomotor Functions in the Frontal Lobe. *Annu. Rev. Vis. Sci.* **1**, 150724172340006 (2015).
6. Purcell, B. A., Weigand, P. K. & Schall, J. D. Supplementary Eye Field during Visual Search: Saliency, Cognitive Control, and Performance Monitoring. *J. Neurosci.* **32**, 10273–10285 (2012).
7. Stuphorn, V., Brown, J. W. & Schall, J. D. Role of Supplementary Eye Field in Saccade Initiation: Executive, Not Direct, Control. *J. Neurophysiol.* **103**, 801–816 (2010).
8. Alnæs, D. *et al.* Pupil size signals mental effort deployed during multiple object tracking and predicts brain activity in the dorsal attention network and the locus coeruleus. *J. Vis.* **14**, 1–1 (2014).
9. Hess, E. H. & Polt, J. M. Pupil Size in Relation to Mental Activity during Simple Problem-Solving. *Science* **143**, 1190–1192 (1964).

10. Schall, J. D. On building a bridge between brain and behavior. *Annu. Rev. Psychol.* **55**, 23–50 (2004).
11. Pouget, P. The cortex is in overall control of ‘voluntary’ eye movement. *Eye* **29**, 241–245 (2015).
12. Chen, M. *et al.* Two subdivisions of macaque LIP process visual-oculomotor information differently. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E6263–E6270 (2016).
13. Chen, M., Liu, Y., Wei, L. & Zhang, M. Parietal cortical neuronal activity is selective for express saccades. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 814–823 (2013).
14. Dorris, M. C., Paré, M. & Munoz, D. P. Neuronal activity in monkey superior colliculus related to the initiation of saccadic eye movements. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 8566–8579 (1997).
15. Edelman, J. A. & Keller, E. L. Activity of visuomotor burst neurons in the superior colliculus accompanying express saccades. *J. Neurophysiol.* **76**, 908–926 (1996).
16. Sparks, D., Rohrer, W. H. & Zhang, Y. The role of the superior colliculus in saccade initiation: a study of express saccades and the gap effect. *Vision Res.* **40**, 2763–2777 (2000).
17. Boehnke, S. E. & Munoz, D. P. On the importance of the transient visual response in the superior colliculus. *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**, 544–551 (2008).
18. Dias, E. C. & Bruce, C. J. Physiological correlate of fixation disengagement in the primate’s frontal eye field. *J. Neurophysiol.* **72**, 2532–2537 (1994).
19. Schlag-Rey, M., Amador, N., Sanchez, H. & Schlag, J. Antisaccade performance predicted by neuronal activity in the supplementary eye field. *Nature* **390**, 398–401 (1997).

20. Brown, M. R. G., Vilis, T. & Everling, S. Frontoparietal activation with preparation for antisaccades. *J. Neurophysiol.* **98**, 1751–1762 (2007).
21. Johnston, K. & Everling, S. Monkey Dorsolateral Prefrontal Cortex Sends Task-Selective Signals Directly to the Superior Colliculus. *J. Neurosci.* **26**, 12471–12478 (2006).
22. Stuphorn, V. The role of supplementary eye field in goal-directed behavior. *J. Physiol. Paris* **109**, 118–128 (2015).
23. Coe, B., Tomihara, K., Matsuzawa, M. & Hikosaka, O. Visual and Anticipatory Bias in Three Cortical Eye Fields of the Monkey during an Adaptive Decision-Making Task. *J. Neurosci.* **22**, 5081–5090 (2002).
24. Amador, N., Schlag-Rey, M. & Schlag, J. Reward-predicting and reward-detecting neuronal activity in the primate supplementary eye field. *J. Neurophysiol.* **84**, 2166–2170 (2000).
25. Nakamura, K., Roesch, M. R. & Olson, C. R. Neuronal activity in macaque SEF and ACC during performance of tasks involving conflict. *J. Neurophysiol.* **93**, 884–908 (2005).
26. Matsumoto, M. & Hikosaka, O. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature* **459**, 837–841 (2009).
27. Belova, M. A., Paton, J. J., Morrison, S. E. & Salzman, C. D. Expectation modulates neural responses to pleasant and aversive stimuli in primate amygdala. *Neuron* **55**, 970–984 (2007).
28. Stuphorn, V. & Schall, J. D. Executive control of countermanding saccades by the supplementary eye field. *Nat. Neurosci.* **9**, 925–931 (2006).

29. Vogt, B. A., Finch, D. M. & Olson, C. R. Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* **2**, 435–443 (1992).
30. Stoet, G. & Snyder, L. H. Neural correlates of executive control functions in the monkey. *Trends Cogn. Sci.* (2009) doi:10.1016/j.tics.2009.02.002.
31. Bush, G. *et al.* Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn. Sci.* **4**, 215–222 (2000).
32. Zhao, R. *et al.* Neuropathic Pain Causes Pyramidal Neuronal Hyperactivity in the Anterior Cingulate Cortex. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, (2018).
33. Shenhav, A., Botvinick, M. M. & Cohen, J. D. The Expected Value of Control: An Integrative Theory of Anterior Cingulate Cortex Function. *Neuron* **79**, 217–240 (2013).
34. Metzler-Baddeley, C. *et al.* Cingulum microstructure predicts cognitive control in older age and mild cognitive impairment. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 17612–17619 (2012).
35. Amiez, C., Joseph, J. P. & Procyk, E. Reward encoding in the monkey anterior cingulate cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* **16**, 1040–1055 (2006).
36. Pardo, J. V., Pardo, P. J., Janer, K. W. & Raichle, M. E. The anterior cingulate cortex mediates processing selection in the Stroop attentional conflict paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 256–259 (1990).
37. Sallet, J. *et al.* Expectations, gains, and losses in the anterior cingulate cortex. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* **7**, 327–336 (2007).
38. Shackman, A. J. *et al.* The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 154–167 (2011).

39. Rangel, A. & Hare, T. Neural computations associated with goal-directed choice. *Curr. Opin. Neurobiol.* **20**, 262–270 (2010).
40. Chein, J. & Schneider, W. The Brain's Learning and Control Architecture. *Curr. Dir. Psychol. Sci. - CURR Dir. PSYCHOL SCI* **21**, 78–84 (2012).
41. Kahneman, D. & Beatty, J. Pupil diameter and load on memory. *Science* **154**, 1583–1585 (1966).
42. Claron, J. *et al.* Large scale functional ultrasound imaging of the spinal cord reveals in depth spatiotemporal responses of spinal nociceptive circuits in both normal and inflammatory state. *Pain* (2020) doi:10.1097/j.pain.0000000000002078.
43. Lindquist, M. A., Meng Loh, J., Atlas, L. Y. & Wager, T. D. Modeling the hemodynamic response function in fMRI: Efficiency, bias and mis-modeling. *NeuroImage* **45**, S187–S198 (2009).
44. Andreassi, J. L. *Psychophysiology: Human Behavior & Physiological Response*. (Psychology Press, 2013).
45. Beatty, J. & Lucero-Wagoner, B. The pupillary system. (2012).
46. Laeng, B., Sirois, S. & Gredebäck, G. Pupillometry: A Window to the Preconscious? *Perspect. Psychol. Sci. J. Assoc. Psychol. Sci.* **7**, 18–27 (2012).
47. Filipowicz, A. L., Glaze, C. M., Kable, J. W. & Gold, J. I. Pupil diameter encodes the idiosyncratic, cognitive complexity of belief updating. *eLife* **9**, (2020).
48. Kahneman, D. *Attention and effort*. (Prentice-Hall, 1973).
49. Ebitz, R. B. & Moore, T. Selective Modulation of the Pupil Light Reflex by Microstimulation of Prefrontal Cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **37**, 5008–5018 (2017).

50. Lehmann, S. J. & Corneil, B. D. Transient Pupil Dilation after Subsaccadic Microstimulation of Primate Frontal Eye Fields. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **36**, 3765–3776 (2016).
51. Jainta, S. & Baccino, T. Analyzing the pupil response due to increased cognitive demand: An independent component analysis study. *Int. J. Psychophysiol.* **77**, 1–7 (2010).
52. Wang, C.-A., Brien, D. C. & Munoz, D. P. Pupil size reveals preparatory processes in the generation of pro-saccades and anti-saccades. *Eur. J. Neurosci.* **41**, 1102–1110 (2015).
53. Dizeux, A. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates. *Nat. Commun.* **10**, 1–9 (2019).
54. Blaize, K. *et al.* Functional ultrasound imaging of deep visual cortex in awake nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 14453–14463 (2020).
55. Joshi, S. & Gold, J. I. Pupil Size as a Window on Neural Substrates of Cognition. *Trends Cogn. Sci.* **24**, 466–480 (2020).

Chapitre 4. Imagerie fonctionnelle de la volonté chez le primate non-humain dans le cortex cingulaire antérieur

La volonté est la faculté de vouloir, de se déterminer à quelque chose^{xviii}, d'exercer un choix guidé par la raison. En opposition aux instincts naturels et aux désirs, la volonté peut être vue comme l'expression du libre-arbitre chez ses sujets ou comme la capacité de faire un choix sans contrainte extérieure. Si la volonté est un sujet de prédilection pour de nombreux philosophes (Platon, Descartes, Schopenhauer, Nietzsche et de nombreux autres), la recherche scientifique n'est pas en reste depuis l'avènement des techniques de neuroimagerie, notamment dans le domaine de la neuropsychologie. Dans les années 1970, Benjamin Libet met en avant l'existence du *Bereitschaftspotential* (« potentiel de préparation ») enregistré, par électrophysiologie, lors de la désormais célèbre expérience de Libet où est mesuré, dans le cortex moteur et les aires motrices supplémentaires, une activité en préparation au mouvement volontaire. La première mise en évidence de la préparation inconsciente au mouvement conscient date de 1964 (Helmut *et al.*, Université de Fribourg) et suggère que des processus inconscients contrôlent à la fois le mouvement moteur mais aussi la sensation d'avoir pris une décision de faire ce mouvement. La notion de volonté n'est imagée qu'en surface, souvent par électroencéphalographie chez l'Homme, ne permettant pas, ou peu, de discriminer spatialement une origine du signal. Dans notre cas, le cortex frontomédian, dans lequel se situe le cortex cingulaire antérieur, lié directement à la notion d'effort, de récompense et de résolution des conflits nous permet d'imager directement une manifestation vasculaire du potentiel de préparation, montrant pour la première fois chez le primate non-humain des manifestations de la volonté et plus largement du libre-arbitre. Dans cette partie, nous commencerons par une introduction générale à la notion de volonté, puis à la notion de libre-arbitre, afin de tenter de définir ces termes, et ce à l'aide des points de vues de différents penseurs, dans un but essentiellement informatif, avant de nous intéresser aux résultats de l'imagerie vasculaire dans le cortex cingulaire antérieur et aux manifestations de l'action volontaire chez le primate non-humain lors d'une tâche de saccades/antisaccades et sa comparaison aux mouvements non-volontaires, ou induits.

^{xviii} <https://www.dictionnaire-academie.fr/article/A8V0757>

Nous réutiliserons, sans réexplication, des notions présentées au début du chapitre précédent ainsi que les mêmes abréviations.

4.1. Notions sur la volonté

La volonté peut être définie comme la faculté d'exercer un choix libre, gouverné par la raison. Nous ne pouvons donner une définition stricte de la volonté, tant celle-ci possède de multiples facettes en fonction de l'angle sous laquelle elle est abordée. Notion indissociable de la notion de désir, la volonté peut être perçue comme l'expression du libre-arbitre, notion que nous aborderons dans un second temps. Si pour Kant et Descartes, la volonté est une notion purement humaine, puisqu'elle s'exerce au-delà des désirs humains et lui permet de disposer de lui-même, d'autres philosophes, notamment la philosophie épicurienne définissent la volonté comme une faculté naturelle visant à réguler le comportement, applicable donc aux animaux. D'autres philosophes, dont celle de Schopenhauer, à laquelle nous nous intéresserons brièvement, définissent la volonté comme notion de *vouloir-vivre*, lutte incessante du vivant pour sa survie : « [c'est] la seule expression vraie de la plus intime essence du monde, Tout aspire et s'efforce à l'existence, et si possible à l'existence organique, c'est-à-dire à la vie, et, une fois éclos, à son plus grand essor possible »^{xix}

4.1.1. Introduction

La production d'une action, la volonté de faire une action, est associée à l'*intentionnalité*. Pour produire un acte volontaire, il faut qu'il y ait intention d'acte : représentation consciente de l'acte, anticipation de ses effets et de ses résultats et décision du passage à l'acte. A l'opposé de la volonté, nous retrouvons le *désir*, qui, au contraire de la volonté, n'est pas basé sur la raison mais sur la « passion ». Le désir est un mouvement spontané, dans lequel l'acte d'intentionnalité est absent. La volonté, agissant sur les désirs, permet d'effectuer un choix entre ceux-ci, d'en privilégier certains aux dépens d'autres ; la volonté est donc plus réfléchie que le désir.

^{xix} Schopenhauer, *Le Monde comme volonté et représentation*, Chapitre XXVIII

Comme nous le verrons dans une seconde partie, l'existence même de la volonté permet de se poser des questions sur l'existence du libre-arbitre. Si nos choix *volontaires* nous apparaissent libres, le déterminisme, dont Spinoza est un des penseurs fondateurs, suggère qu'ils ne sont que l'expression d'une causalité qui nous dépasse, que cette causalité soit biologique, socioculturelle, physique, etc., et que notre volonté n'est qu'une illusion. Cette illusion d'être libre sous-entendrait que nous sommes soumis à des forces ou des principes (naturels, socioculturels, etc.) qui dépassent notre entendement et qui déterminent, complètement ou en partie, nos choix à notre insu.

4.1.2. Idées sur la volonté chez les penseurs grecs

Les penseurs grecs, à proprement dire, n'ont pas de notion de volonté, mais seulement d'actes volontaires. Aristote définit l'acte volontaire comme étant la superposition d'agir par soi-même et d'agir en connaissance de cause (désir et connaissance, respectivement). Ainsi, faire preuve d'acte volontaire correspond à agir spontanément et agir en connaissance des effets et conséquences de nos actes.

4.1.3. Idées sur la volonté chez Descartes

Selon Descartes, la volonté est considérée comme une faculté uniquement humaine. Il s'agirait, selon lui, de la faculté la plus étendue et la plus large de l'humain : « je ne conçois point l'idée d'aucune autre [faculté] plus ample et plus étendue »^{xx}. Descartes suggère que la volonté n'est pas seule dans la détermination *libre* d'un choix, mais est conjuguée avec la connaissance de ce choix et de ses possibles retombées, il s'agirait de la combinaison du *pouvoir de connaître* (ou entendement), qui est une faculté limitée par essence, et du *pouvoir de choisir* (ou volonté) qui, au contraire, est une faculté absolue. En effet, chez Descartes, la volonté est la capacité de « faire une chose, ou ne pas la faire »^{xx} sans aucune autre distinction des retombées du choix.

La volonté, avec le sens donné par Descartes, est une notion très proche de la notion de libre-arbitre et est une notion binaire : nous avons la volonté de faire ou la volonté de ne pas faire : nous ne pouvons pas déterminer des degrés de volonté. La

^{xx} Descartes, *Méditations métaphysiques*, IV.

confrontation entre l'entendement et la volonté est la source de l'erreur humaine : si la volonté est un absolu nous permettant de choisir entre faire et ne pas faire, indépendant du vrai ou du faux, l'entendement ou connaissance permet de concevoir que tout n'est pas binaire, et que nos facultés de connaissances sont limitées, voir plongées dans l'illusion.

4.1.4. Idées sur la volonté chez Schopenhauer

Au contraire de Descartes, le concept de la volonté chez Schopenhauer est « *volonté de vivre* », philosophie selon laquelle chaque espèce lutte pour sa propre survie dans le monde. Cette volonté de vivre s'exprime pour une espèce par un conflit constant entre elle et les autres. Cette *vouloir-vivre* est, chez Schopenhauer, l'essence même du monde et elle est libre, inconditionnée. Cependant, cette liberté reste soumise au principe de causalité (qui s'exerce sous la forme de *motivation* chez l'homme et les animaux) et s'approche donc d'un certain déterminisme.

4.1.5. Idées sur la volonté chez Nietzsche

Selon Nietzsche, tout acte volontaire, en tant qu'il est acte d'application de la volonté, est défini comme étant composé :

- De sentiments, au sens de sensations. Sensation de l'état de départ, du mouvement et de l'état final
- D'une pensée, qui commande l'acte volontaire, indissociable du vouloir
- D'une envie de commander, d'être obéi
- De conclusions et de jugements, souvent erronés, nés du fait que nous sommes le commandant et le commandé.

Pour Nietzsche, la volonté n'est généralement possible que lorsqu'elle s'attend à être obéie, à générer un acte volontaire. Cependant, comme nous l'avons vu plus haut, Nietzsche possède une vue complexe de la volonté, qui n'est pas composée seulement par

l'acte : il dissocie donc les deux concepts, l'acte étant « une version simplifiée » de la volonté.

Comme nous allons le voir dans une seconde partie, Nietzsche définit alors le libre-arbitre comme un état de contentement du « sujet voulant » qui commande et réalise l'action, la volonté servant à surmonter les résistances à la réalisation de l'acte.

Après avoir survolé les grands penseurs sur la notion de volonté, le but de cette thèse n'étant pas de faire une analyse philosophique de la notion de volonté chez les différents penseurs mais de définir le terme de volonté, nous pensons, à titre personnel, avoir un point de vue plus proche de celui de Descartes, la volonté définie comme la capacité absolue de faire ou de ne pas faire, mais que celle-ci doit se conjuguer à la connaissance des retombées des actes déterminés par la volonté pour pouvoir faire un choix *libre*. Nous ne pensons pas que tout est prédéterminé à l'avance, comme le propose en un sens Schopenhauer et comme nous le verrons plus tard, Spinoza, mais que l'homme est capable, en soi et pour soi, de se déterminer lui-même dans la réalisation de ses actes. Une fois la notion de volonté déterminée, nous allons nous intéresser plus en détail à la notion de libre-arbitre telle que définie par, à nouveau, quelques penseurs avant d'essayer de décrire plus en détail comment repenser cette question à la lumière des connaissances neurobiologiques d'aujourd'hui.

4.2. Notions sur le libre-arbitre

4.2.1. Définition

Par définition, le libre-arbitre est la faculté par laquelle la volonté se détermine à une chose plutôt qu'à une autre indépendamment des déterminations extérieures à elle-même^{xxi}. Le libre-arbitre est une philosophie opposée au déterminisme et au fatalisme, dont nous n'explicitons ici que le premier.

Le libre-arbitre, ou *liberum arbitrium* en latin, est une forme contractée de « libre-arbitre de la volonté » et est donc indissociable de la notion de volonté que nous avons explicitée dans la partie précédente. En effet, le libre-arbitre peut être défini comme étant

^{xxi} <https://www.dictionnaire-academie.fr/article/A9A2367>

une puissance de la volonté, elle est une forme de la volonté elle-même, mais dans un état particulier. En effet, il s'agit de la volonté dans sa libre disposition d'elle-même : vouloir, c'est être capable et apte à décider librement, c'est donc, par définition, être libre et avoir une capacité de libre-arbitre. A cette manière, le libre-arbitre se manifeste particulièrement dans la réalisation d'un choix.

4.2.2. Éléments sur la liberté d'indifférence

Cependant, nous pouvons nous demander ce qui se passe dans le cadre de choix strictement équivalents, c'est le problème de la liberté d'indifférence. Un exemple de la liberté d'indifférence est l'âne de Buridan : il s'agit d'une fable selon laquelle un âne serait mort de faim entre 2 ballots équidistants et strictement identiques d'avoine, incapable de choisir entre les deux rations de nourriture. S'il s'agit évidemment d'un exemple poussé à l'absurde, il pose le problème du choix entre des biens identiques. Le libre-arbitre de la volonté, en tant que volonté, est cependant doué de spontanéité, il peut donc se déterminer à choisir, il est donc capable de choisir *arbitrairement* entre deux choix qu'il détermine comme étant strictement équivalents.

4.2.3. Idées sur le déterminisme de Spinoza

Spinoza est l'un des philosophes clefs de la pensée sur le déterminisme. Commencant par mettre l'homme à sa place dans ce qu'il appelle la Nature, celui-ci croyant à tort qu'il est un « comme un empire dans un empire », Spinoza place l'homme comme une partie de la Nature, et chaque sentiment, émotion et passion humaine sont des conséquences des causes ses lois.

Ce déterminisme fort de Spinoza va souvent à l'encontre de la façon dont nous nous voyons et dont nous nous plaçons dans le monde, car nous croyons instinctivement que nous agissons de notre fait, dans la libre-disposition de nous-même. Nous expérimentons, tous les jours, l'illusion que nous sommes responsables de nos actes et de nos pensées. Cette philosophie, allant à l'encontre de celle de Descartes sur la volonté et le libre-arbitre, que nous avons décrite plus tôt (voir 4.1.3), et qui placerait l'homme comme une exception dans la Nature (car il est capable d'être la source même de ses causes, c'est-à-dire d'être une cause non causée) est pour Spinoza une aberration.

L'illusion du libre-arbitre, chez Spinoza, trouverait son origine dans le caractère incomplet de notre conscience : en effet, nous avons conscience de nos envies, de nos désirs, mais nous n'avons pas conscience des causes de ces désirs, qui appartiennent donc à la Nature et à l'inconscient. Nous croyons alors disposer d'un libre-arbitre alors que nous sommes purement déterminés, comme toutes les choses de la nature.

On peut alors se demander comment Spinoza peut définir la liberté, le fait d'être libre pour l'homme en l'absence de libre-arbitre. Cette question métaphysique de la liberté chez Spinoza (à laquelle nous cherchons simplement à donner des pistes de réflexion) peut trouver un début de réponse dans la *Lettre à Schuller* : « Les hommes sont conscients de leurs désirs et ignorants des causes qui les déterminent ».

4.2.4. Libre-arbitre et neurosciences

Commencant dans les années 1980 avec l'article de B.Libet (Figure 77) : *Time of conscious intention to act in relation to onset of cerebral activity (readiness-potential)*, l'exploration du libre-arbitre par les neurosciences, notamment à la suite de Kornhuber et Deecke (qui découvrirent le *bereitschaftspotential* en 1965 comme un signal cortical se passant avant un mouvement) est posé. Libet se demande alors si ce signal peut être non seulement enregistré avant le mouvement, mais même avant l'intention consciente du mouvement. Dans son expérience, il montre que le potentiel de préparation, inconscient, commence à croître environ une demi-seconde avant même que n'arrive à la conscience le désir de bouger : le sujet déclare une intention de bouger **après** que le cerveau ait commencé à encoder une action, suggérant que celui-ci prévoit cette dernière de manière inconsciente bien avant l'accès réel à la conscience.

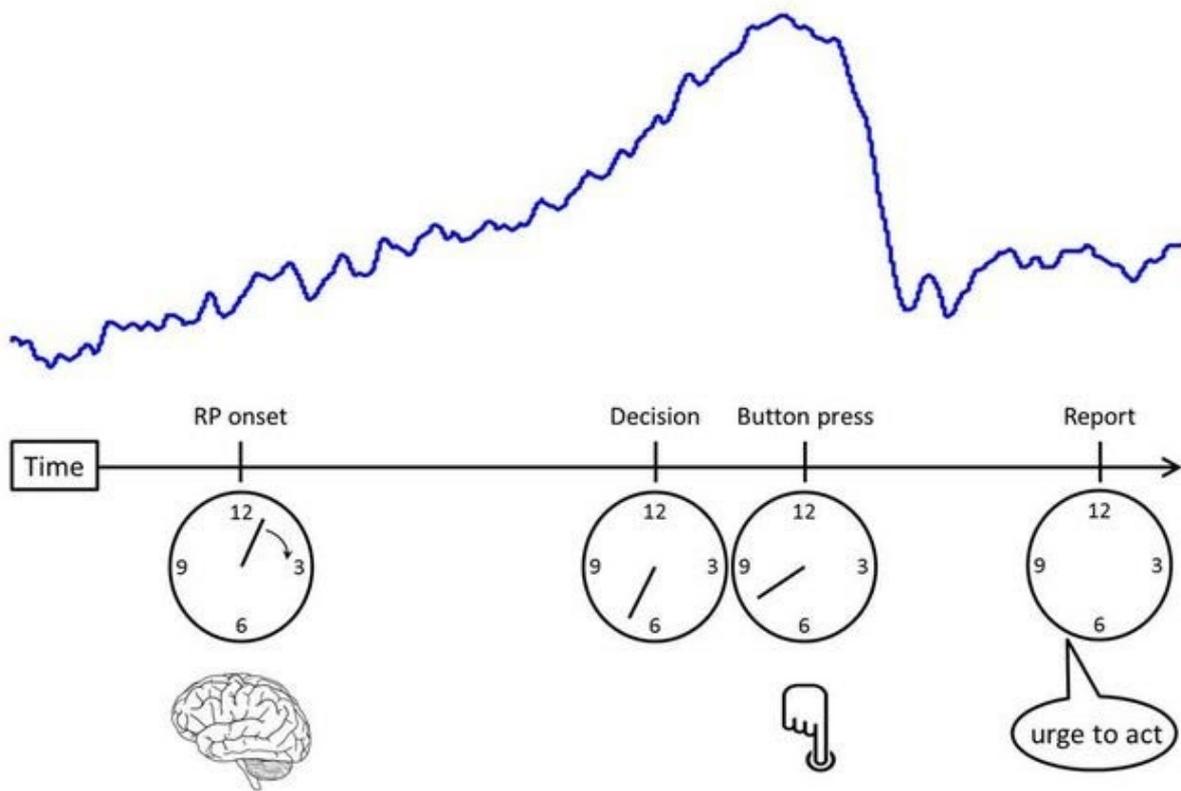


Figure 77. Expérience de B. Libet avec le BP en bleu et les moments subjectifs correspondant représentés sur les horloges en dessous. Le *bereitschaftspotential* BP (ou RP) commence bien avant l'accès à la conscience rapporté (et donc à la décision). Ici, le BP commence vers 1 (sur l'horloge) tandis que la décision est prise d'appuyer vers 7, pour un appui vers 8. *A posteriori*, le sujet déclare avoir eu l'intention de presser sur le bouton vers 7, soit bien après le départ du BP, indiquant un accès à la conscience bien plus tardif que la réalité mesurée du BP.

Si les résultats de l'expérience de B. Libet penchent en faveur d'un certain épiphénoménisme, notamment car le processus est déjà en route lorsque arrive l'accès à la conscience et que l'action physique est déjà enclenchée quand arrive le phénomène mental (ici, la conscience), le sujet posséderait quand même un pouvoir de veto fort (le *free won't*), le potentiel de préparation ne déclenchant pas forcément, au final, une action physique. Il est difficile, voire impossible, d'avoir accès aux processus neuronaux inconscients sous-jacents à la création d'un processus conscient, et l'existence même du potentiel de préparation ne remet pas en cause l'existence du libre-arbitre. En effet, nous ne pouvons pas écarter la thèse selon laquelle il existe un processus inconscient libre et non-déterministe qui conduit au déclenchement du potentiel de préparation au sein du

cerveau avant un mouvement. En 2004, Daniel Wegner, professeur de psychologie expérimentale, publie *The Illusion of Conscious Will*, où il réfute l'existence du libre arbitre, en soutenant que l'accès à la conscience peut être manipulé, et que, par conséquent, la perception d'un contrôle conscient est une illusion. Cette démonstration expérimentale du « meilleur tour de passe-passe de l'esprit » (*the mind's best trick*) se base sur l'inférence entre deux événements. Si un événement est causé par un événement précédent, alors, selon Wegner, nous avons :

- Le premier événement est précédent au second,
- Le premier événement est cohérent avec le fait d'avoir causé le second.

Pour illustrer ces 2 propos, nous pouvons prendre l'exemple d'un événement du quotidien, comme la chute d'un objet sur le sol. L'objet chute, puis nous entendons un bruit, c'est l'ordre logique. Par une expérience de pensée, imaginons seulement que nous entendons le bruit puis que l'objet chute, alors nous violons la première proposition, il n'y a plus causalité des événements. Imaginons maintenant que l'objet tombe, et que l'on entende non pas un bruit sourd, mais l'aboiement d'un chien, alors nous violons la seconde proposition, les deux événements ne sont pas cohérents. Wegner applique ces mêmes propositions à la conscience et au libre-arbitre : nous expérimentons une pensée, cohérente avec notre comportement, puis nous nous observons réaliser ce même comportement. Par causalité, nous pensons que nos pensées ont permis la réalisation de ce mouvement. Cependant, il arrive à manipuler cette causalité et montre que

A Model of Conscious Will

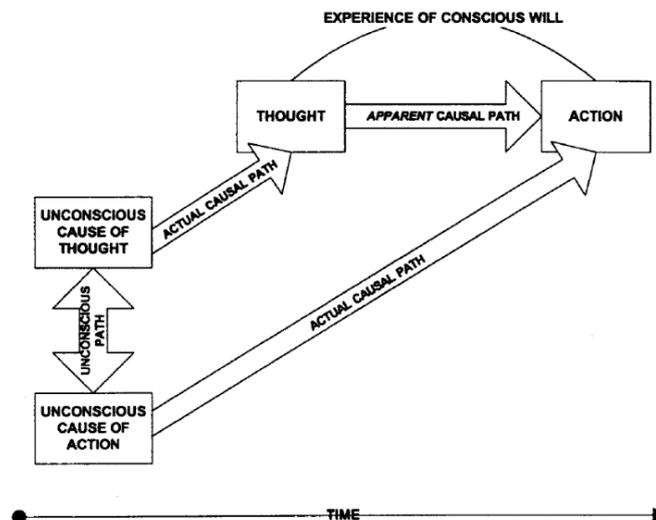


Figure 78. D'après Wegner *et al.*, 1999. Modèle de la volonté conscience et construction d'une action et d'une pensée volontaire.

l'expérience de la volonté et du libre-arbitre est, selon lui, une illusion. Il propose alors un schéma pour le chemin causal réel et le chemin causal apparent (Figure 78).

4.3. Le cortex cingulaire antérieur est responsable de la partie volontaire du libre arbitre dans la reprise d'une tâche motrice

Après cette introduction et définition des termes de volonté et libre-arbitre et des différents points de vue philosophiques, dont le court développement sert tant à situer les différentes pensées sur la volonté et le libre-arbitre, à titre informatif, qu'à définir les termes de notre sujet, nous nous intéressons maintenant à son expression d'un point de vue des neurosciences et notamment à l'expression de la volonté dans la partie libre-arbitre *de la volonté*. Après une brève introduction, nous étudierons la tâche soumise à nos primates non-humains avec laquelle nous avons pu étudier, de manière purement fortuite, l'expression de la volonté dans le cortex cingulaire antérieur de nos singes, avant de s'intéresser plus en détail à une étude premièrement qualitative de la volonté puis plus quantitative. Il est à noter que ces données ne sont proposées que pour le singe S, le singe G n'ayant pas encore été soumis, par manque de temps, au protocole permettant l'expression de son libre-arbitre. A cet effet, aucune analyse statistique sur les deux animaux ne sera proposée.

4.3.1. Introduction

Les mécanismes permettant l'expression de l'intentionnalité ont toujours été le centre d'intenses débats. Comme nous l'avons vu précédemment, depuis les philosophes de la Grèce Antique comme Platon, Aristote puis, plus tard, Descartes et nombre d'autres, il existe un débat entre les points de vues dualiste et déterministe sur la façon dont les pensées immatérielles animent le corps. Au XX^{ème} siècle, la mise au point de techniques d'électrophysiologie pour mesurer l'activité *in vivo* du cerveau à la fois chez l'animal de laboratoire et l'humain ont permis d'isoler une activité de préparation à la réalisation d'une tâche, appelé le *Bereitschafts Potential* (BP) au niveau des aires frontales médiales (pour une revue systématique de la littérature, voir Shibasaki & Hallett¹). Le mauvais rapport signal-à-bruit et la grande variabilité intra-individuelle de l'activité neuronale requièrent un très grand nombre d'enregistrements de la même

condition, temporalisé en réponse à un stimulus externe (visuel ou auditif). Cependant, une part très importante de l'intentionnalité réside dans la capacité de *librement* initier un mouvement au lieu de le réaliser en réponse à un stimulus externe. Elle est donc en ce sens beaucoup plus difficile à étudier que la réponse à un stimulus externe. La *libre* initiative d'un mouvement réside dans la capacité de la motivation intrinsèque de l'homme (ou de l'animal) à réaliser une action, à l'opposé des mouvements réflexes ou induits en réponse à une stimulation extérieure. Les mouvements nés du libre-arbitre de la volonté sont précédés d'un BP, comme montré par B. Libet en 1983²(Figure 77), mais les réseaux neuronaux à l'origine de ces actions libres restent très flous.

L'intentionnalité se réfère à une séquence d'évènements organisés hiérarchiquement, ces séquences permettent de déterminer le « quoi » le « quand » et le « pour quoi » des composantes d'une intention³. Un individu est tout d'abord traversé par l'idée du mouvement, c'est « l'intention de mouvement », puis un mouvement est sélectionné parmi tous les mouvements possibles et accessibles à l'individu, c'est « la sélection libre du mouvement », correspondant à la composante « quoi » de l'intention. Le « quand » correspond à la temporalité du mouvement, doit-il être exécuté maintenant ou plus tard, tandis que le « pour quoi » se rapporte à la possibilité d'inhiber, au dernier moment, la décision qui a été prise en amont. Finalement, le mouvement *libre* se réalise quand les trois composantes du « quoi, quand, pour quoi » sont congruentes, donnant le signal interne de réalisation du mouvement. Ce travail ne va pas s'attarder sur la séquence qui conduit à l'initiation du mouvement, mais plutôt sur la temporalité des évènements d'activité cérébrale qui vont conduire à l'initiation d'un mouvement libre.

Les réseaux neuronaux associés aux trois composantes de l'intentionnalité ont été étudiés chez l'humain en utilisant des techniques classiques de neuroimagerie, telle que, entre autres, l'électroencéphalographie. Ces techniques présentent le désavantage de difficilement combiner une bonne résolution spatiale avec une bonne résolution temporelle, rendant difficile l'étude des réseaux neuronaux liés à la genèse de mouvements libres. En 1983, dans l'expérience de Libet, le sujet rapporte être conscient de l'intention de bouger après le démarrage du potentiel de préparation, présent à travers de larges aires frontales médiales, suggérant que l'intention de mouvement se prépare bien avant le mouvement lui-même, et bien avant l'accès à la conscience de l'intention même. De nombreuses études ont étudié le sentiment subjectif de la volition, ou

autrement dit, « l'intention consciente » ou « conscience motrice », et suggèrent un rôle crucial du cortex cingulaire antérieur et des aires pré motrices supplémentaires³⁻⁸. Les retours subjectifs représentent un temps très court pendant lequel il est possible d'étudier la conscience d'une action avant l'action elle-même, mais ne donnent aucune information sur la complexité des processus précoces sous-jacents à l'intentionnalité. Indépendamment de l'étude des sentiments expérimentés par les sujets, des études par neuroimagerie ou électrophysiologie ont, chez l'homme ou le primate non-humain, exploré les réseaux neuronaux responsables de la préparation de mouvements générés spontanément^{3,9-13}. La comparaison entre ces mouvements libres et ces mouvements réflexes ont permis d'isoler une large portion du cortex fronto-médian en tant que réseau de connectivité incluant le cortex cingulaire antérieur et les aires motrices supplémentaires^{10,12,13}. La composante « pour quoi » implique les aires prémotrices supplémentaires, comme montré par les tâches de Go/NoGo¹³.

Les activations au sein du cortex frontomédian ont été activement rapportées dans des études sur le conflit et le choix libre, et donc peuvent être potentiellement source d'erreurs confondantes entre les deux, et donner de nombreuses interprétations différentes. Premièrement, les activations attribuées au conflit peuvent être entièrement liées à un système neuronal servant à la volition, et inversement, suggérant que seulement un de ces processus permet l'intervention du cortex frontomédian. Dans un second temps, le même système peut être activé, équitablement, par les deux processus, donnant alors du fil à retordre à une distinction entre les deux. Troisièmement, les activations fonctionnelles observées peuvent être le résultat de l'interaction entre les deux processus, soit car l'un influence l'autre, soit car la présence simultanée des deux processus permet l'activation d'un troisième. Finalement, la volition et le conflit peuvent activer des zones corticales très proches dans le cortex frontomédian, et les mesures ne pas être assez précises pour distinguer les deux. Pour comprendre le rôle de cette région dans le contrôle des actions volontaires, nous devons donc essayer de nous naviguer et de nous placer dans ces différentes interprétations possibles.

Dans cette étude, nous proposons une interprétation de régions clefs du cerveau, le COS et le CCA, impliquées dans l'initiation d'action volontaire en utilisant une nouvelle technique d'imagerie qui combine une excellente résolution spatiale (100x100 μm^2) et temporelle (2,5 Hz) avec un très bon rapport signal à bruit, nous permettant, pour la première fois, de mesurer une activité vasculaire précédant une reprise volontaire du travail, avec l'avantage fort de pouvoir mesurer cette activité sur

un essai unique et de ne pas avoir besoin de moyennner, comme fait avec l'électroencéphalographie et l'IRMf.

4.3.2. Matériel et Méthodes

Le Matériel et Méthode est exactement identique à celui de l'étude précédente sur la pupille et les champs oculomoteurs supplémentaire, voir 3.2.

4.3.3. Résultats

Les reprises volontaires de tâche ont été enregistrées chez $N = 1$ macaque rhésus (*macaca mulatta*, 10kg, 21 ans). La tâche à laquelle est entraîné notre primate non-humain est une tâche de prosaccade et d'antisaccade, de la même nature qu'au chapitre précédent, dépendamment de l'orientation d'un rectangle à l'écran (voir Figure 63 pour l'explication complète de la tâche). Cependant, contrairement à la tâche précédente, aucune modulation de la récompense n'est présente, et le primate est laissé à la libre appréciation de lui-même quant au nombre d'essais et à la l'exécution de ces derniers. La tâche était néanmoins arrêtée peu après la fin de l'enregistrement ultrasonore (env. 1h), quel que soit le nombre d'essais réalisés dans la tâche.

Durant cette tâche, nous nous sommes fortuitement rendu compte que le singe arrête parfois de travailler pour prendre une pause, ne fixant alors plus le point de fixation permettant de déclencher la saccade. Durant cette pause, le regard du primate erre sur l'écran, de façon aléatoire, ou bien le singe a les yeux fermés. Nous nous intéressons, dans un premier temps qualitativement, à ce qu'il se passe dans deux zones du cortex : les champs oculomoteurs supplémentaires (comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent et tel que décrit par Dizeux et al.¹⁴) et le cortex cingulaire antérieur, qui sont tous deux compris dans notre plan d'imagerie ultrasonore, pour observer l'activité de ces zones corticales à deux moments : lors de l'induction de la tâche, au moment de la première fixation après la ligne de base, et au moment d'une reprise *volontaire* du travail après une pause.

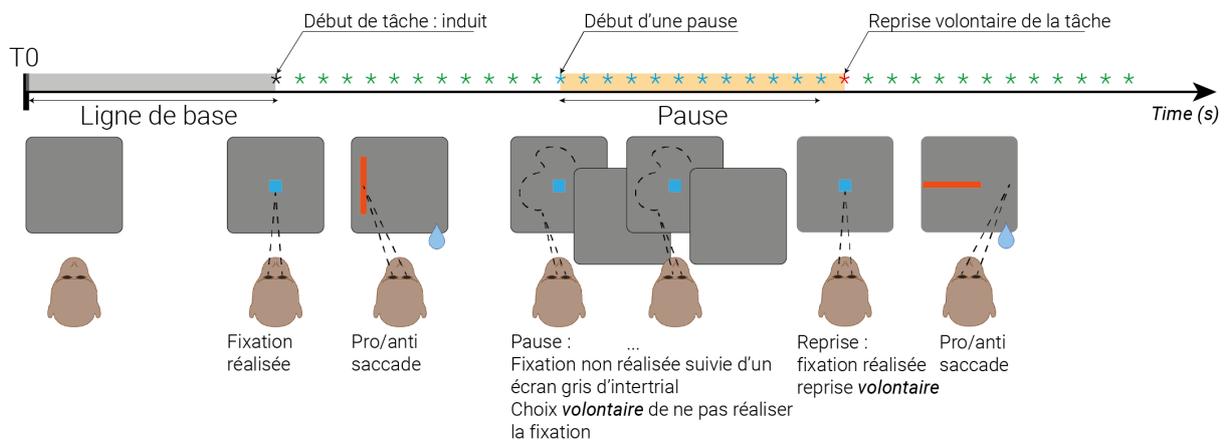


Figure 79. Description temporelle de la tâche avec la présence d'une pause. Au début d'une tâche, et afin de pouvoir déterminer l'activité vasculaire au « repos », une ligne de base (200 à 220 secondes, aléatoire) est enregistrée avant le début de la tâche oculomotrice. La tâche commence ensuite, par la première fixation : il s'agit d'une induction de la tâche (étoile noire), puis enchaîne les fixations pro/anti saccades (étoiles vertes). A un moment, le singe choisit *volontairement* d'arrêter de travailler : il ne fixe alors pas le point de fixation, ne déclenchant pas la présentation de l'indice permettant la saccade ou l'antisaccade ; c'est le début de la pause *volontaire* (étoiles bleues : fixations non réalisées). Le singe choisit, sans perturbation de son état interne (e.g. : rappel à l'ordre à travers la porte, etc.) de reprendre *volontairement* le travail, c'est la reprise *volontaire* de la tâche (étoile rouge) en réalisant à nouveau la fixation puis pro/anti, avant de continuer, comme précédemment, d'enchaîner les fixations (étoiles vertes) et les pro/antisaccades.

Pour ce faire, nous allons d'abord décrire la fonction de réponse hémodynamique chez le singe S, sa détermination et son utilisation, notamment dans la construction d'un signal que nous appellerons « signal théorique » et qui devrait correspondre au signal que l'on attendrait si nous nous tenons aux essais dont la fixation est réalisée, et nous verrons ensuite la comparaison entre ce signal « théorique » et le signal « réel » enregistré dans le COS et le CCAd.

4.3.3.1. Détermination de la fonction de réponse hémodynamique

Pour pouvoir déterminer quel est le signal que nous appelons « signal théorique » avec lequel nous allons comparer les activités respectives des COS et du CCAd, nous devons, dans un premier temps, déterminer la fonction de transfert nous permettant de passer du peigne de Dirac des évènements à la réponse hémodynamique attendue. Cette

fonction de transfert est matérialisée sous la forme de la *fonction de réponse hémodynamique*. Similairement au travail que nous avons effectué précédemment (voir 3.3.2.3), nous déterminons une fonction de transfert type pour le singe S

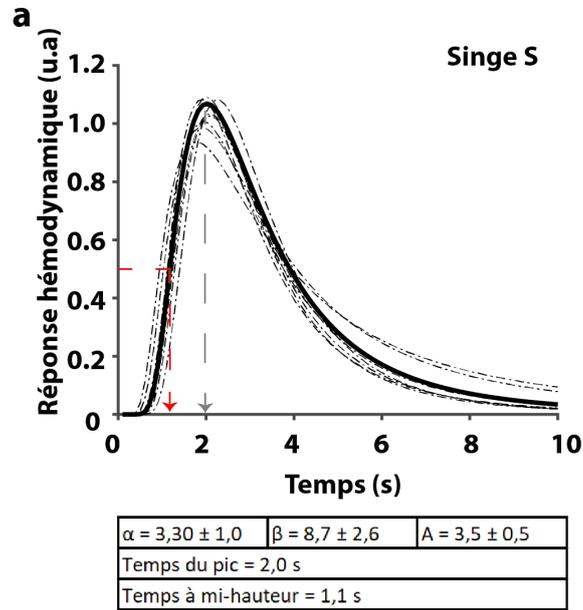


Figure 80. Fonction de réponse hémodynamique du singe S avec $A = 3,5 \pm 0,5$; $\alpha = 3,3 \pm 1,0$ et $\beta = 8,7 \pm 2,6$. En pointillé : les réponses pour les sessions individuelles. En trait noir plein : la moyenne de toutes les sessions. N = 9 sessions.

Pour rappel, la fonction de réponse hémodynamique pour les ultrasons est de la forme suivante^{15,16} :

$$FRH : t \rightarrow A * \frac{\beta^\alpha}{\Gamma(\alpha)} * t^{-(\alpha+1)} * \exp\left(-\frac{\beta}{t}\right)$$

Eq 2. Equation de la fonction de réponse hémodynamique déterminée pour les ultrasons

Avec l'absence d'un second terme, le VSC n'ayant ni *dips* initial ni final mesurable, contrairement au signal BOLD obtenu en IRMf.

Une fois que nous avons déterminé la fonction de réponse hémodynamique, nous pouvons déterminer ce que nous allons appeler le « signal théorique » et le comparer au signal « mesuré » dans différentes régions du cerveau, notamment les champs

oculomoteurs supplémentaires, que nous avons étudié au chapitre précédent, et le cortex cingulaire antérieur, zone d'intérêt principale de ce chapitre.

4.3.3.2. Détermination du signal « théorique » calculé

La réponse hémodynamique étant maintenant connue, nous pouvons déterminer la fonction qui serait attendue dans le cadre des activations fonctionnelles, comme fait en IRMf. Si nous prenons le temps de chaque évènement de fixation réussi, juste avant la présentation de l'indice de saccade, et nous convoluons ce « peigne de Dirac » avec la fonction de réponse hémodynamique déterminée précédemment pour obtenir un signal « théorique » nous obtenons le signal « théorique calculé ».

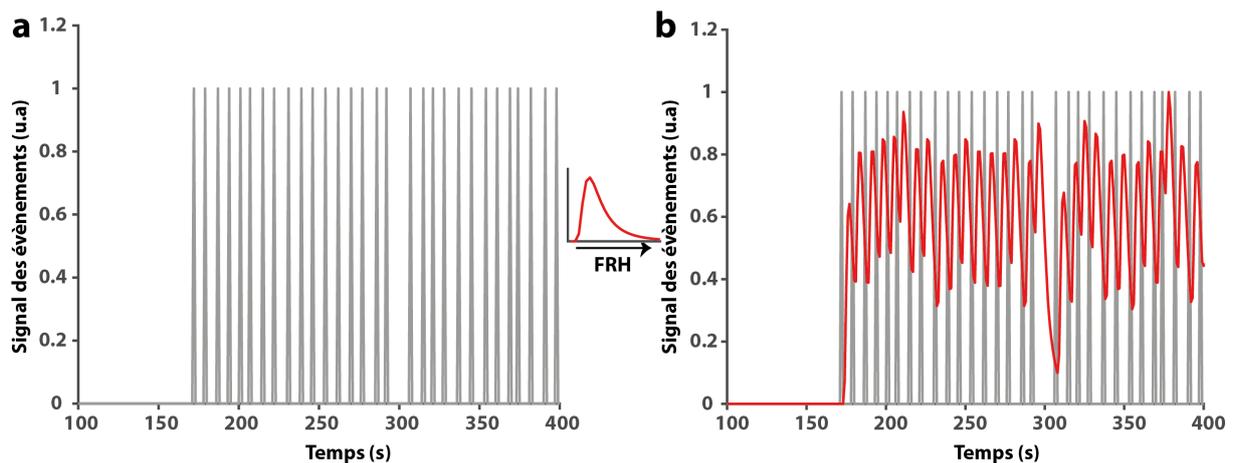


Figure 81. Détermination du signal d'activation théorique à partir du peigne des évènements et de la fonction de réponse hémodynamique. (a) Fonction du peigne des évènements. Un pic gris est le temps d'une fixation réalisée (b) En rouge, on trouve la convolution de la HRF déterminée précédemment et de la fonction en (a). On observe un lag entre la réponse grise et la réponse rouge, comme attendu par la convolution de la réponse hémodynamique avec le peigne des évènements.

Une fois que nous avons cette fonction qui serait attendue si le signal que l'on mesure est exactement lié aux évènements, nous sommes capables d'étudier les différences entre ce signal et le signal dans les deux zones d'intérêt de cette étude : le COS et le CCAd. Dans ce chapitre, nous allons surtout nous intéresser à deux temps très précis de

la tâche, ayant en commun le passage d'une période de non-travail à une période de travail : le début de la tâche, ou induction de la tâche et la reprise volontaire de la tâche.

4.3.3.3. Etude vasculaire de l'induction de la tâche dans les COS et le CCA.

Nous allons commencer par étudier l'induction de la tâche, c'est-à-dire la toute première fixation proposée et réalisée après l'enregistrement de la ligne de base. Il convient tout d'abord de délimiter les zones anatomiques que nous désirons étudier. Dans la même veine que le chapitre précédent, nous désirons étudier les champs oculomoteurs supplémentaires (COS) et le cortex cingulaire antérieur (CCA)

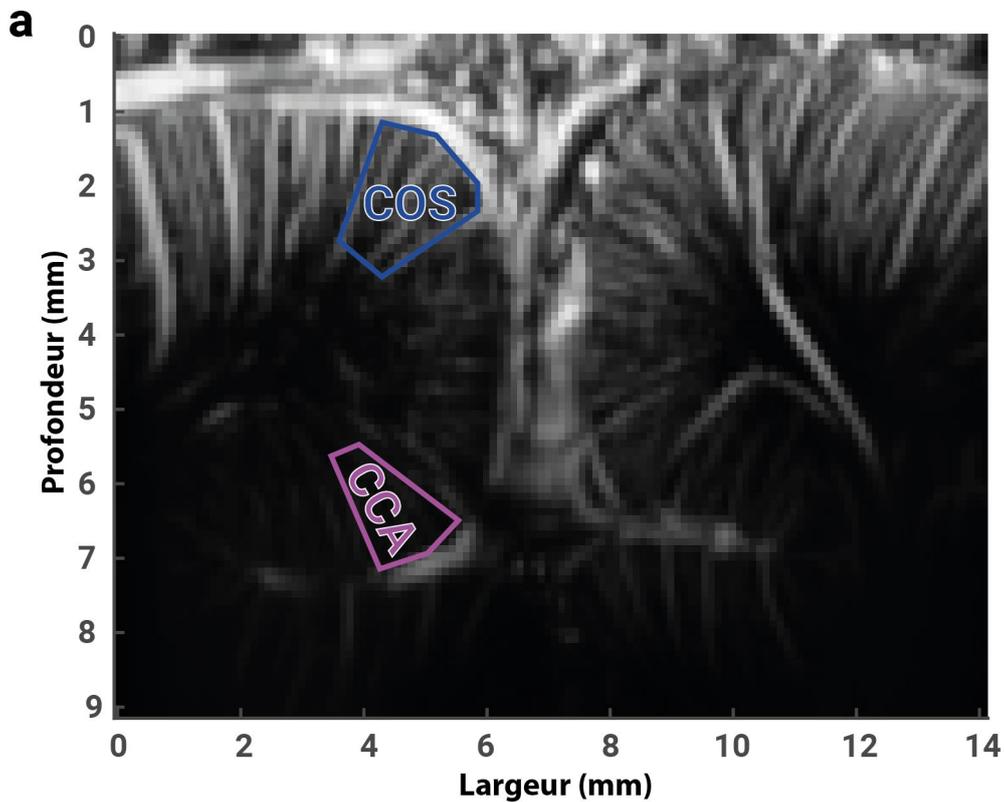


Figure 82. Coupe frontomédiane du cerveau du macaque rhésus imagé en imagerie Doppler ultrarapide. (a) Délimitation des aires anatomiques du champ oculomoteur supplémentaire (COS) et du cortex cingulaire antérieur (CCA) au sein de la coupe frontomédiane chez le singe S.

Une fois délimitées les aires corticales d'intérêt, nous pouvons étudier la temporalité entre les signaux mesurés dans le COS et le CCA et déterminer s'il y a simultanéité ou s'il existe un décalage entre ces deux signaux.

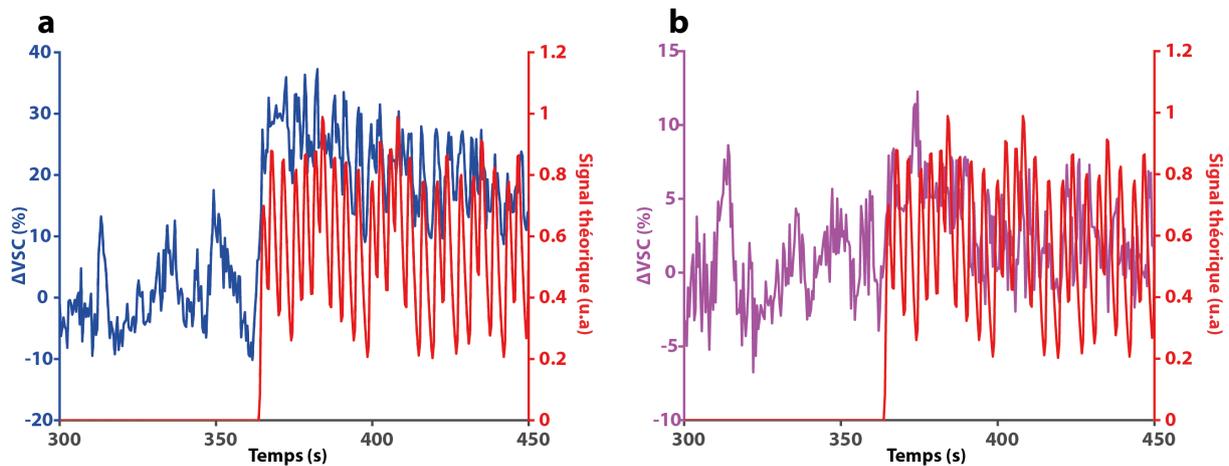


Figure 83. Exemple de comparaison entre les signaux mesurés dans le COS et le CCA pour un début de tâche (induction) (a) dans le COS, nous n'observons pas de décalage temporel entre le signal mesuré (bleu) et le signal attendu (rouge) (b) dans le CCA (mauve), la marche initiale n'est pas aussi marquée que dans le COS, et semble de beaucoup plus faible amplitude. Aucun décalage ne semble non plus mesuré dans le CCA

Au niveau de l'induction de la tâche, juste après la ligne de base, nous ne mesurons aucun décalage significatif entre le signal attendu et le signal mesuré (Figure 83), montrant à la fois que nos signaux semblent bien recalés et qu'il n'y a pas d'activité précédant la tâche. Ce résultat semble logique pour deux raisons principales : durant la ligne de base, aucune tâche n'est proposée, donc il n'y a pas lieu d'avoir une activité corticale liée à la tâche, ni dans le COS, directement lié à l'accomplissement de la tâche, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, ni dans le CCA, lié, par exemple, à la récompense.

Durant la tâche, nous remarquons que le singe réalise parfois des pauses, plus ou moins longues, pendant lesquelles il ne travaille pas. C'est, au moment de la reprise de ces tâches, que nous allons maintenant étudier un marqueur de la volonté dans le cerveau des primates

4.3.3.4. Etude vasculaire d'une reprise volontaire de la tâche dans le COS et le CCAd

Durant la tâche de saccades chez le singe, le rythme de travail n'est pas constant. Bien que nous présentions un essai toutes les 4 secondes environ (durée légèrement aléatoire pour éviter tout effet d'anticipation), il arrive parfois que le singe choisisse *volontairement* d'arrêter de travailler pour une durée plus ou moins importante : ce sont les *pauses volontaires*, que nous allons maintenant chercher à caractériser tant d'un point de vue comportemental que d'un point de vue vasculaire.

Tout d'abord, nous devons commencer par définir le terme de *pauses* au sein de notre tâche. Une pause sera définie de la manière suivante :

- La tâche continue d'être présentée et n'est pas réalisée : les yeux sont soit fermés, soit explorent l'environnement sans chercher à réaliser la tâche,
- Elle est d'une durée suffisante (d'au minimum 60 secondes),
- Elle ne contient pas ou peu d'essais isolés,
- La reprise du travail est franche et d'au moins 10 essais consécutifs réalisés.

Durant ces pauses, nous veillons à ne pas perturber le primate, à ne pas parler, à ne pas faire de bruit, pour ne pas, possiblement, induire une reprise du travail due à une perturbation de l'environnement extérieur. Le singe est donc laissé à la libre-appréciation de lui-même sur le moment de la pause, sa durée et le moment de la reprise du travail (Figure 84)

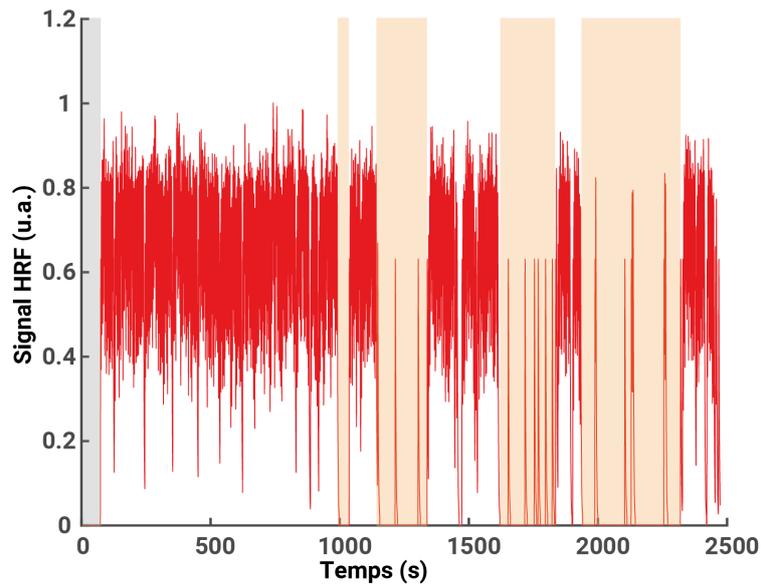


Figure 84. Exemple descriptif d'une pause durant une tâche cognitive oculomotrice. En gris clair, à gauche : ligne de base. Aucune tâche n'est présentée et le singe ne travaille pas. En orange clair : pauses durant la tâche. Durant ces pauses, nous avons peu d'essais isolés et la reprise du travail est franche (voir les critères énoncés ci-dessus). Durant cette tâche, nous avons $N = 4$ pauses.

Nous observons parfois des essais isolés sans reprise soutenue de travail, qui peuvent être par exemple dus à une fixation dont le temps est relativement faible (temps aléatoire entre 200 et 800 ms) et où l'exploration de l'environnement se trouve assez longtemps, par pur hasard, dans la région d'intérêt de la fixation, déclenchant ainsi l'indice de saccade et la réalisation de celle-ci. Nous ne tenons pas compte des essais isolés, et nous ne considérons pas un essai isolé comme suffisant pour rompre une pause.

Une fois le concept de pause explicité, nous pouvons nous intéresser à l'activité vasculaire à la reprise volontaire du travail. Cette reprise, déterminée par le singe pour lui-même, rentre dans le concept de *libre* reprise du travail, sans aucune contrainte.

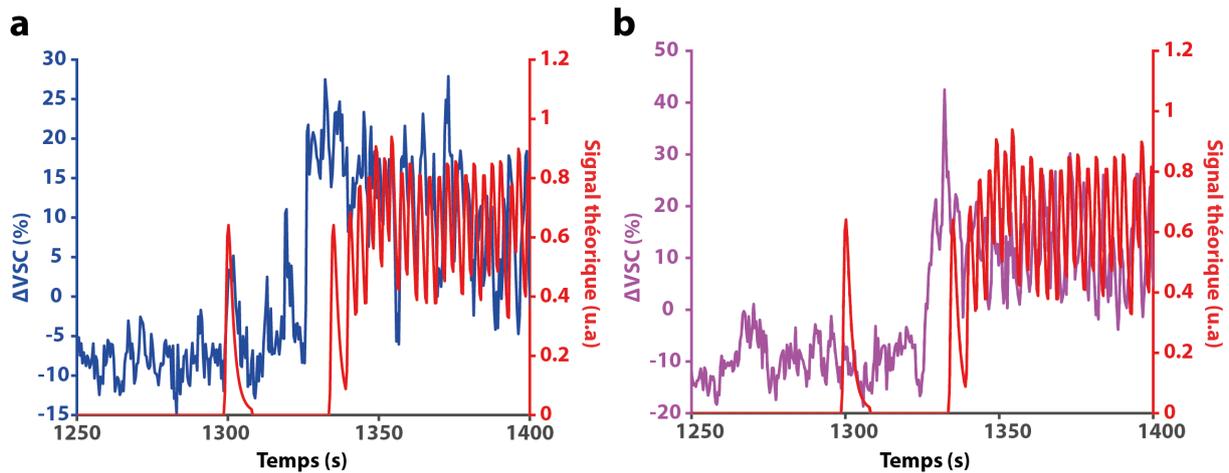


Figure 85. Exemple sur une séance de la comparaison entre le signal au moment d'une reprise soutenue après une pause. (a) signal dans le COS, avec en bleu le signal mesuré dans le COS (échelle de gauche) et en rouge (échelle de droite) le signal attendu. On observe un décalage temporel au moment de la reprise du travail. (b) même chose dans le CCA (mauve, axe de gauche). On observe un décalage temporel au moment de la reprise du travail.

Nous observons que, dans le cas d'une reprise volontaire du travail, il semble y avoir une préparation vasculaire à la tâche avec une remontée du ΔVSC bien avant la reprise de la tâche (Figure 85) si on le compare au signal attendu tel qu'obtenu par convolution du peigne des évènements avec la fonction de réponse hémodynamique. Cette préparation vasculaire à la tâche peut être vu, par analogie avec le potentiel de préparation en électroencéphalographie, dont nous avons parlé plus tôt, à un potentiel de préparation neurovasculaire (PPV), et donc lié à la volonté de la reprise du travail.

La quantification de ce potentiel de préparation n'est pas chose aisée, car nous n'avons, avec les primates non-humain, pas de retours subjectifs sur le « quand » décrit précédemment dans l'expérience de Libet (Figure 77), ni un accès aux sensations des primates, qui nous permettraient de décrire plus précisément quand est-ce que l'animal a senti l'envie de reprendre la tâche.

Si à l'heure où est écrit ce manuscrit, nous tentons plusieurs approches pour la quantification de ce potentiel de préparation vasculaire, nous allons présenter ici la méthode qui nous semble la plus directe pour la mesure du PPV.

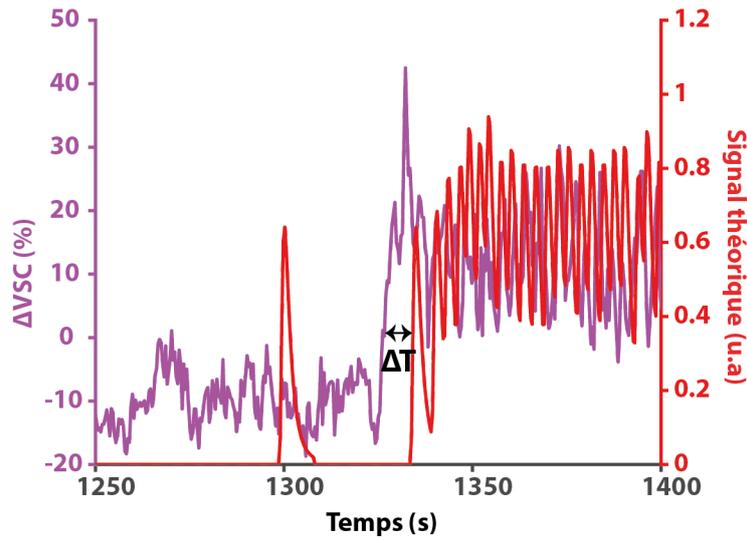


Figure 86. Exemple de mesure du ΔT du potentiel de préparation vasculaire entre le signal mesuré dans le CCA et le signal attendu (en rouge).

Pour ce faire, nous prenons la moyenne du signal ΔVSC dans le CCA (représenté en bleu sur la Figure 85) plus une fois sa déviation standard (représenté en jaune sur la Figure 85) et nous prenons le dernier point de dépassement du ΔVSC juste avant la fixation conduisant à la reprise de la tâche oculomotrice, c'est le temps t_1 . De même, nous recalons le zéro du signal attendu (en rouge) sur la ligne bleue ainsi que la hauteur du pic pour qu'il corresponde environ à la hauteur du signal mesuré et nous prenons le point de passage de la courbe rouge par rapport à la ligne jaune, c'est le temps t_2 . Nous effectuons ensuite la différence $\Delta T = t_2 - t_1$ pour obtenir le décalage dû au potentiel de préparation neurovasculaire que nous mesurons.

Comme montré sur la Figure 85, le signal semble présent à la fois dans le COS et dans le CCA, mais il semble beaucoup plus intense et rapide dans cette dernière zone si nous regardons toutes les sessions, c'est pour cela que nous avons choisi de faire la quantification dans le CCA en priorité.

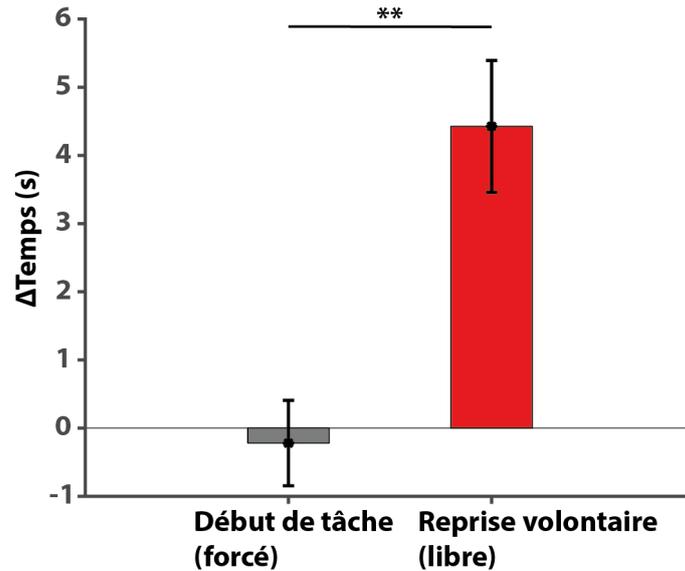


Figure 87. Comparaison du ΔT entre le début de la tâche (en gris) et la reprise volontaire après une pause (en rouge) sur $N = 6$ débuts de tâches et $N = 24$ pauses. ** $p < 0,01$

En étudiant le décalage temporel entre le signal attendu et le début de la tâche (gris, Figure 87) et la reprise volontaire (rouge, Figure 87) nous observons un fort décalage en faveur d'une remontée précédant la tâche pour la reprise volontaire ($4,3 \pm 0,8$ s, e.t.m) alors qu'il n'y a pas de montée précédant la tâche à la fin de la ligne de base ($-0,2 \pm 0,5$ s, e.t.m), indiquant que cette remontée précédant la reprise volontaire de la tâche pourrait correspondre à un potentiel de préparation vasculaire, dans la même veine que le potentiel de préparation mesurée en électroencéphalographie.

4.3.4. Discussion

Afin de pouvoir comprendre les processus conscients, nous avons besoin de comprendre quelles sont les différences entre les processus volontaires et les processus réflexes. Une définition des actions volontaires est la possibilité de choisir entre les réaliser ou ne pas les réaliser³ ; *a contrario*, même s'il est possible pour un individu de choisir d'inhiber un comportement réflexe, l'initiation de ce dernier n'est pas la résultante d'un choix mais la résultante d'un événement, souvent externe, de l'environnement. Pour cette raison, les études qui se sont penchées sur les signes caractéristiques des actions volontaires se sont particulièrement intéressées au choix entre au moins deux actions

possibles avec la condition que le choix résultant est le moins possible sujet au biais de stimuli extérieurs^{4,12}. L'étude du « choix-libre » ou d'un comportement « pré-déterminé » est considérée comme étant le plus à même de donner des informations sur les mécanismes neuronaux de la volition, capacité de choisir entre plusieurs plans d'actions volontaires.

Une conséquence inévitable du choix entre différents plan d'actions est le conflit potentiel entre eux. Ce conflit peut être considéré comme maximal si aucun plan d'action n'est préférable à un autre, comme c'est nécessairement le cas dans un plan d'action en « choix-libre ». Ainsi, un système neuronal identifié en utilisant un paradigme expérimental de libre choix pourrait être, en réalité, responsable de la résolution de conflits entre des plans d'actions incompatibles entre eux, à lieu d'être responsable d'un processus de volition pour le choix entre plusieurs plans d'actions : le choix d'utiliser des paradigmes de choix libres pourraient ainsi être pour l'étude de la volition pourrait ainsi être entaché de l'étude du conflit en lieu et place de la volition. Inversement, l'étude du conflit, par les tâches créées à cet effet, comme le paradigme de Stroop (que nous avons explicité précédemment) ou la tâche d'accompagnement d'Eriksen confrontent une action réflexe ou dont l'apprentissage est fortement ancré en opposition avec une autre action moins fortement spécifiée par les circonstances environnementales qui le définissent. S'il existe un système neuronal permettant le choix entre différentes actions volontaires, ce système serait moins engagé dans une tâche réalisant des actions automatiques. En conséquence, la comparaison entre l'activité neuronale des actions volontaires et des actions automatiques (ici la reprise volontaire de la tâche et l'induction de la tâche après la ligne de base) devrait permettre de révéler l'activité due, non seulement au conflit, mais aussi à la volition. De plus, la résolution du conflit entre les mouvements de saccades dans notre expérience pourrait être reflétée par une activité au sein du CCA, une structure médiane impliquée dans le contrôle des saccades durant un conflit, et possédant des connexions directes avec les centres oculomoteurs du tronc cérébral.

Enfin, nous montrons que nous sommes capables de mesurer un aspect de la volition, pour la première fois chez le primate non-humain, avec une sensibilité suffisante pour effectuer cette mesure sur un essai unique, contrairement aux mesures du potentiel de préparation chez l'humain qui nécessite une moyenne sur plusieurs réalisations. Cet aspect de la volition est présent dans le plan frontomédian que nous imageons, notamment au niveau du COS et du CCA, nous permettant d'étudier pour la première fois par imagerie les activations dues à un choix-libre par un primate dans la libre-disposition de lui-même.

4.4. Bibliographie du chapitre

1. Shibasaki, H. & Hallett, M. What is the Bereitschaftspotential? *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* **117**, 2341–2356 (2006).
2. Libet, B., Gleason, C. A., Wright, E. W. & Pearl, D. K. Time of conscious intention to act in relation to onset of cerebral activity (readiness-potential). The unconscious initiation of a freely voluntary act. *Brain J. Neurol.* **106 (Pt 3)**, 623–642 (1983).
3. Haggard, P. Human volition: towards a neuroscience of will. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 934–946 (2008).
4. Lau, H. C., Rogers, R. D., Haggard, P. & Passingham, R. E. Attention to intention. *Science* **303**, 1208–1210 (2004).
5. Desmurget, M. *et al.* Movement Intention After Parietal Cortex Stimulation in Humans. *Science* **324**, 811–813 (2009).
6. Fried, I., Mukamel, R. & Kreiman, G. Internally Generated Preactivation of Single Neurons in Human Medial Frontal Cortex Predicts Volition. *Neuron* **69**, 548–62 (2011).
7. Seghezzi, S., Zirone, E., Paulesu, E. & Zapparoli, L. The Brain in (Willed) Action: A Meta-Analytical Comparison of Imaging Studies on Motor Intentionality and Sense of Agency. *Front. Psychol.* **10**, (2019).
8. Schultze-Kraft, M., Parés-Pujolràs, E., Matic, K., Haggard, P. & Haynes, J.-D. Preparation and execution of voluntary action both contribute to awareness of intention. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **287**, 20192928 (2020).
9. Cui, H. & Andersen, R. A. Posterior Parietal Cortex Encodes Autonomously Selected Motor Plans. *Neuron* **56**, 552–559 (2007).

10. Pesaran, B., Nelson, M. J. & Andersen, R. A. Free choice activates a decision circuit between frontal and parietal cortex. *Nature* **453**, 406–409 (2008).
11. Ariani, G., Wurm, M. F. & Lingnau, A. Decoding Internally and Externally Driven Movement Plans. *J. Neurosci.* **35**, 14160–14171 (2015).
12. Zapparoli, L., Seghezzi, S. & Paulesu, E. The What, the When, and the Whether of Intentional Action in the Brain: A Meta-Analytical Review. *Front. Hum. Neurosci.* **11**, (2017).
13. Zapparoli, L. *et al.* Dissecting the neurofunctional bases of intentional action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 7440–7445 (2018).
14. Dizeux, A. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates. *Nat. Commun.* **10**, 1–9 (2019).
15. Claron, J. *et al.* Large scale functional ultrasound imaging of the spinal cord reveals in depth spatiotemporal responses of spinal nociceptive circuits in both normal and inflammatory state. *Pain* (2020) doi:10.1097/j.pain.0000000000002078.
16. Lindquist, M. A., Meng Loh, J., Atlas, L. Y. & Wager, T. D. Modeling the hemodynamic response function in fMRI: Efficiency, bias and mis-modeling. *NeuroImage* **45**, S187–S198 (2009).

Chapitre 5. Ouverture sur l'enregistrement de l'activité électrophysiologique et de l'activité vasculaire par imagerie ultrasonore

Un grand nombre des études effectuées sur le primate non-humain le sont souvent avec une seule méthode simultanée d'imagerie de l'activité cérébrale. Si l'on désire se situer au plus proche de l'activité électrique du cerveau, nous choisirons l'électrophysiologie, méthode de choix pour la mesure directe de l'activité des neurones^{1,2} ou bien le potentiel de champ locaux (PCL), sur une plus large aire que l'activité d'un seul neurone (AUN pour Activité d'un Unique Neurone) ou d'un groupe de neurones (ANM, Activité de Multiples Neurones). Si on désire maintenant étudier l'activité neuronale grâce au couplage neurovasculaire, s'offrent à nous plusieurs techniques, telles que décrites dans notre introduction générale ; la méthode de choix est l'IRMf³⁻⁵, qui présente cependant le désavantage de devoir anesthésier l'animal (quelques études sont faites sur l'animal vigile mais l'IRM du primate vigile^{6,7} reste marginale comparé à celle du primate anesthésié). Quelques études en ultrasons fonctionnels^{8,9} existent déjà chez le primate, technique de choix pour l'imagerie chez le primate éveillé, tant pour son adaptabilité aux chambres d'enregistrements électrophysiologiques que pour l'excellente résolution spatiale et temporelle qu'elle offre. L'investigation du lien entre le signal neuronal et le signal vasculaire reste marginal¹⁰, tant pour des difficultés techniques de compatibilités entre l'électrophysiologie et l'IRM, dans le cas de la publication de N.K. Logothetis *et al.* en 2001 que pour des raisons d'encombrement stérique autour de l'animal. La combinaison de l'électrophysiologie et de l'imagerie fUS a été réalisée initialement chez le rongeur anesthésié (Macé et al 2011) puis chez le rongeur éveillé, libre de mouvement (Sieu et al 2015). Dans le domaine de l'étude du sommeil, Bergel et al ont montré la forte corrélation entre le signal vasculaire du fUS et les ondes theta et fast Gamma mesurées par LFP (Local Field Potential) dans les périodes REM du sommeil (Bergel et al 2019). En 2015, Sieu et al. (2015) couplent l'EEG avec le fUS chez le rat mobile ; en 2020, Aydin *et al.*¹¹ lient les ultrasons fonctionnels et l'imagerie calcique chez le petit animal, permettant de lier, en surface, l'activité neurale avec le signal mesuré en imagerie fUS, mais cette technique se heurte à une limitation technique : en effet, elle ne permet pas une pénétration suffisante de la lumière pour étudier des zones profondes. Grâce à la miniaturisation des composants d'imagerie fUS, nous proposons, dans cette

étude et pour la première fois chez le primate éveillé réalisant une tâche oculomotrice cognitive, l'enregistrement simultané de l'activité neuronale, des PCL et de l'activité vasculaire mesurée par ultrasons fonctionnels. Nous commencerons par une brève introduction sur la partie technique du couplage entre les ultrasons fonctionnels et l'électrophysiologie avant de nous intéresser aux résultats préliminaires chez un seul animal de la mesure simultanée fUS/électrophysiologie.

5.1. Introduction

L'une des principales limitations à l'enregistrement simultané de l'électrophysiologie avec l'IRM ou le fUS est une question de compatibilité. En effet, l'électrophysiologie est une technique permettant de mesurer de très faibles champs électriques au sein du cerveau, et elle se trouve être très sensible à la moindre perturbation de la cascade du montage, que ce soit pour le contact électrode / préamplificateur, ou même au moindre mouvement au sein du cerveau. Les parasites électromagnétiques entre l'électrophysiologie et l'IRM, technique principalement basée sur la perturbation d'un champ magnétique pour effectuer la mesure de relaxation, comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, rend encore plus compliqué la mesure simultanée, dont N.K. Logothetis est à ce jour, le pionnier¹⁰. Le fUS présente l'indéniable avantage de ne pas être basé sur un champ magnétique, mais sur l'émission d'ondes mécaniques ultrasonores, éliminant de fait le problème de compatibilité électromagnétiques entre les deux techniques. Nous allons d'abord nous intéresser au montage expérimental avant de détailler les premiers résultats obtenus chez nos singes.

5.1.1. Technique du couplage fUS / Electrophysiologie

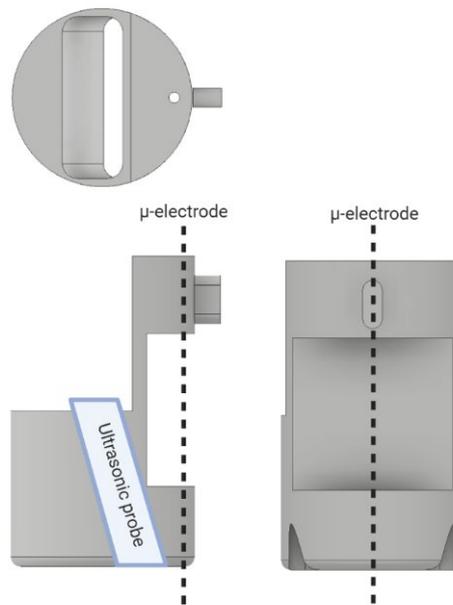


Figure 88. Exemple de pièce permettant le couplage entre l'électrophysiologie, dont l'électrode est ici matérialisée par la ligne discontinue, et la sonde ultrasonore

Le premier défi à relever concerne l'encombrement stérique dans la chambre. La sonde ultrasonore est à peine moins large que le diamètre interne de la chambre (env. 17mm pour env. 19mm de diamètre interne) et si nous désirons deux plans qui se coupent, nous devons soit incliner la sonde, soit la microélectrode. Il nous est plus facile d'incliner la sonde, dont le fil est souple, que la microélectrode, dont le microdescendeur est imposant et est vissé sur la chambre d'enregistrement. Finalement, le format proposé de la pièce est celui avec une sonde inclinée et une microélectrode droite (Figure 88).

Une fois ces pièces réalisées, nous pouvons enregistrer simultanément le fUS et l'électrophysiologie. La sonde est suffisamment blindée pour ne pas avoir de problème de compatibilité électromagnétique entre les deux modes d'enregistrements.

5.1.2. Intérêt du couplage entre le fUS et l'électrophysiologie

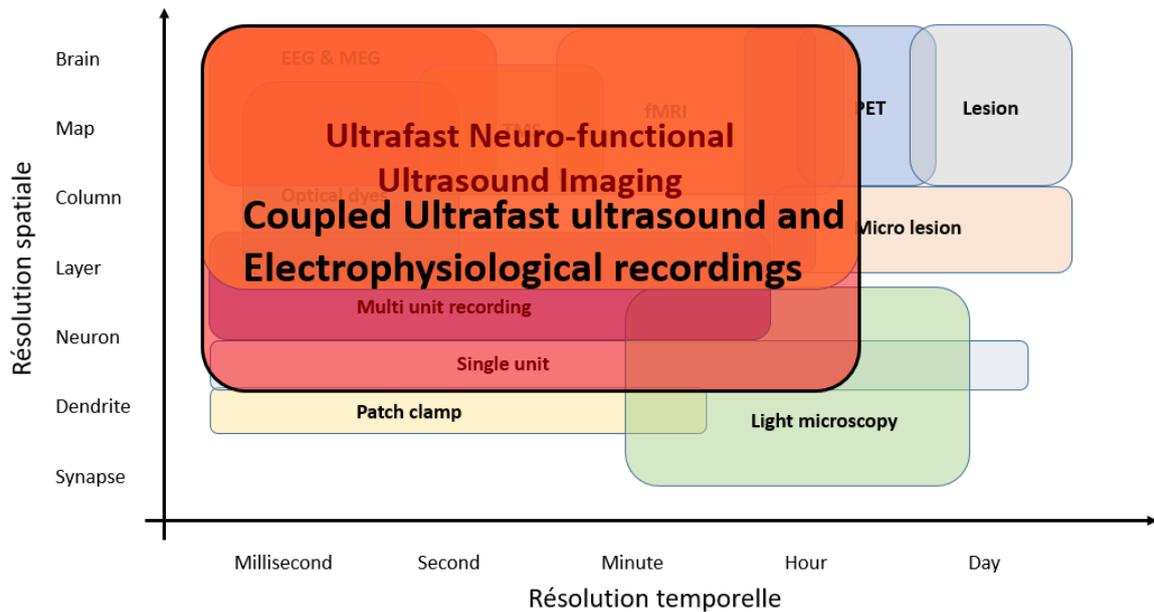


Figure 89. Diagramme de résolution spatiale et temporelle de différentes techniques d'imagerie et positionnement du couplage fUS et électrophysiologie

L'intérêt principal du couplage entre le fUS et l'électrophysiologie est de coupler l'excellente résolution temporelle de l'électrophysiologie, mais son mauvais champ de vue spatial (un seul ou un petit groupe de neurones pour l'activité électrique, et une sphère d'environ 600 μm de diamètre pour les PCL) et sa capacité à donner un accès direct à l'activité électrique des neurones avec une technique dont le champ de vue est bien plus large (de l'ordre de 14 mm de champ de vue pour une résolution spatiale de 100x100 μm^2) avec une résolution temporelle plus faible (de l'ordre de 2,5 Hz) et donnant accès, non pas à l'activité électrique mais à l'activité vasculaire. Le couplage entre ces deux techniques nous permet alors de couvrir une très grande plage de résolution temporelle et spatiale (Figure 89) qui permet à la fois d'imager une tranche de cerveau *in vivo* mais aussi d'étudier le couplage neurovasculaire à travers l'étude des *spikes* (décharges neuronales, nous garderons, dans la suite de cette thèse, le terme de *spikes*). De plus, comme nous le verrons rapidement par la suite, les ultrasons nous permettent de localiser physiquement la pointe de notre microélectrode d'électrophysiologie, nous permettant, pour la première fois chez le primate éveillé, de connaître l'emplacement exact du lieu de l'enregistrement électrophysiologique sans avoir besoin d'effectuer une IRM après de nombreuses découpes pour connaître l'emplacement de l'enregistrement.

5.1.3. Investigation neurophysiologique du signal IRMf (N.K. Logothetis, 2001)

L'investigation neurophysiologique du signal IRMf est effectuée en comparant l'activité des potentiels de champs locaux et de l'activité des neurones aux mesures réalisées en IRM avec le signal BOLD dans le cortex visuel de macaques rhésus.

5.1.3.1. Le signal BOLD : reflet des ANM et des PCL.

Tout d'abord, les auteurs signalent l'importance de la variation d'échelle entre les ANM et les PCL. Si les ANM reflètent majoritairement l'activité d'une population neuronale locale (à une distance d'une centaine de micromètre autour de l'électrode), les PCL peuvent, quant à eux, refléter l'activité d'une zone bien plus large autour de la pointe de l'électrode (jusqu'à quelques millimètres autour de la pointe de l'électrode, résultats à néanmoins mettre en relation avec des publications signalant que la distance de « captage » des PCL peut dépendre de la fréquence captée, si on ne considère pas que le tissu est purement résistif et que des inhomogénéités locales peuvent modifier la propagation du signal électrique¹²). Pour commencer, grâce à une IRM anatomique, les auteurs ont été aptes à visualiser la position de la microélectrode dans le cerveau des primates (Figure 90.a). En utilisant un paradigme permettant l'évocation de réponse dans le cortex visuel des primates, ils montrent que la position de la microélectrode est co-localisée avec la réponse BOLD obtenue par IRMf (Figure 90.b) et ont aussi étudié les relations entre le signal BOLD et les PCL/ANM (Figure 90.c). Cette relation montre que le signal BOLD est retardé par rapport au signal neuronal, et qu'il existe une composante dynamique entre les deux sous la forme d'une fonction de transfert permettant de passer d'un signal neuronal à un signal hémodynamique.

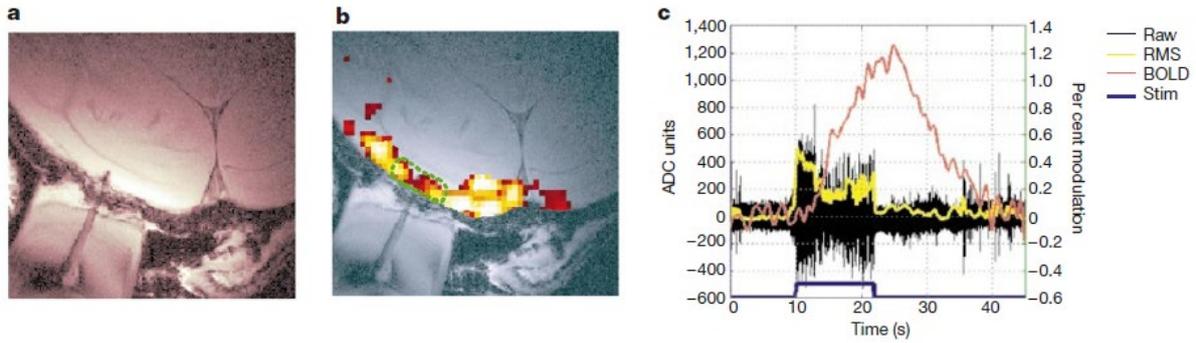


Figure 90. Réponse neuronale et BOLD à un stimulus visuel. (a) Scan anatomique permettant de localiser la position de la microélectrode dans le cerveau (b) Réponse BOLD dans le cortex strié en réponse à une stimulation visuelle (c) Réponse hémodynamique (rouge) superposée à la réponse neuronale (noir)

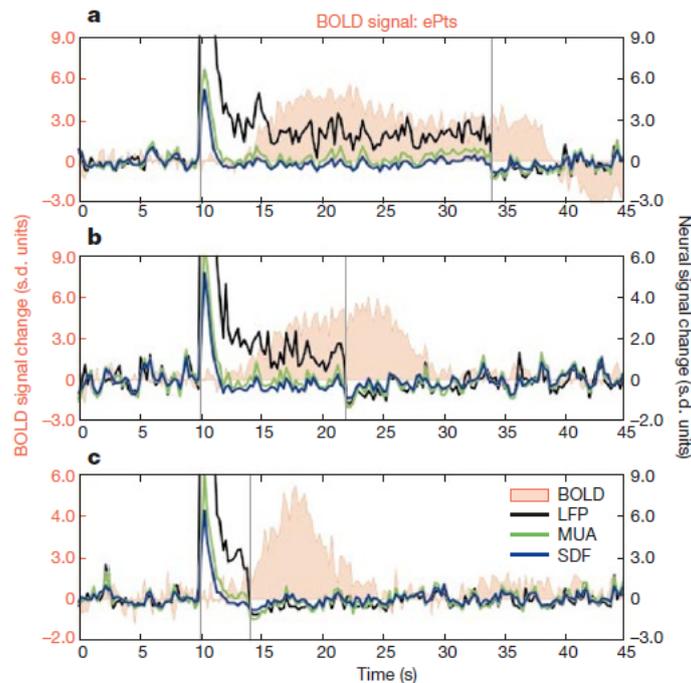


Figure 91. Enregistrement simultané de la réponse neuronale et hémodynamique d'un site cortical montrant une réponse neuronale transitoire. (a-c) Réponses à des stimuli de respectivement 24, 12 et 4 secondes. L'activité des AUN et ANM s'adapte rapidement après le début de la stimulation tandis que le signal PCL restent corrélés avec la réponse BOLD. SDF : Spike density-function

Si nous nous attachons maintenant à regarder comment le signal BOLD et les signaux neuronaux co-varient, nous remarquons une adaptation rapide du signal neuronal tant pour la densité de réponse neuronale (SDF en Figure 91, bleu) que pour la réponse des ANM par rapport au signal BOLD qui semble soutenu tout au long de la stimulation,

même pour les stimuli très longs dans le temps (jusqu'à 24 secondes, Figure 91.a). Cependant, nous remarquons que le signal des PCL reste corrélé avec le BOLD tout au long de la stimulation, indiquant alors que les PCL sont un meilleur reflet de l'activité vasculaire que ne l'est le signal neuronal.

5.1.3.2. Modélisation du signal BOLD à partir des enregistrements neuronaux

Afin de pouvoir répondre à la question du passage de l'activité neuronale à l'activité vasculaire, les enregistrements simultanés de la réponse neuronale et de la réponse hémodynamique ont permis l'application de techniques permettant de calculer la réponse impulsionnelle modèle du mécanisme de passage de la réponse PCL à la réponse BOLD (Figure 92.a)

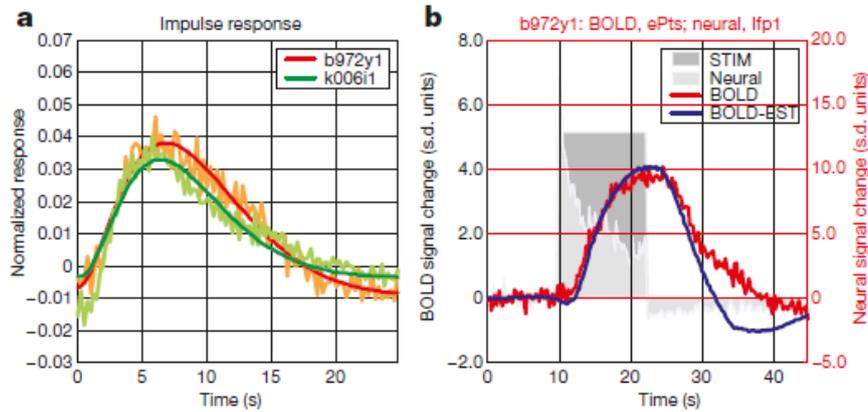


Figure 92. Estimation de la réponse impulsionnelle du système neurovasculaire (a) Réponse impulsionnelle sur 2 sessions, calculées en corrélant les PCL avec la réponse BOLD. (b) Validation du modèle (bleu) par rapport à la réponse réelle (rouge). Le rectangle gris foncé montre la stimulation tandis que la courbe gris clair montre la réponse neuronale enregistrée.

En convoluant la réponse des PCL à la réponse impulsionnelle, les auteurs observent que la réponse impulsionnelle issue de la covariance entre les PCL et le BOLD donne, en moyenne, un bien meilleur estimateur de la réponse neuronale que celle issue des ANM (Figure 92.b pour un BOLD estimé à partir des réponses neuronales et le BOLD mesuré, respectivement en bleu et en rouge).

5.1.3.3. Discussion

Les auteurs ont, dans cette étude, examiné la relation entre le signal BOLD issu de l'IRMf et l'activité neuronale sous-jacente dans une expérimentation de mesure simultanée de l'activité neuronale corticale et d'imagerie fonctionnelle chez le primate anesthésié. La réponse vasculaire est donnée comme étant, grossièrement, un filtre passe-bas de la réponse neuronale, présentant un *dips* initial, souvent attribué à une augmentation importante de la concentration en désoxyhémoglobine avant l'arrivée flux sanguin local plus important. L'article suggère aussi que les PCL sont de meilleurs estimateurs de l'activité vasculaire que ne le sont les ANM, notamment car l'activité des PCL reste élevée tout au long d'une stimulation alors que celle enregistrée pour un ou plusieurs neurones retourne rapidement à une ligne de base. Les auteurs soulignent alors que la contribution plus importante des PCL est cohérente avec la vision bioénergétique sous-jacente du signal BOLD mesuré en IRM, notamment par l'exploration de l'activité métabolique, à travers la concentration en certains neurotransmetteurs et en glucose.

Notre étude est intimement liée à cet article de N.K. Logothetis, en ce que nous cherchons à explorer le domaine de l'activité vasculaire et neuronale dans des enregistrements simultanée de ces deux grandeurs. Cependant, notre étude présente une différence fondamentale qui réside non seulement dans le lieu de l'enregistrement, situé non dans le cortex visuel mais dans une aire préfrontale, au niveau des champs oculomoteurs supplémentaires mais aussi dans la grandeur mesurée, qui est, dans notre cas, directement le volume sanguin cérébral et non pas le rapport $[Hb]/[HbO]$ comme mesuré par le signal BOLD en IRMf. Par ailleurs, contrairement à cet article qui effectue son étude chez le primate anesthésié et étudie des réponses évoquées passives, nous sommes capables d'étudier des réponses évoquées actives couplées au comportement chez le primate éveillé.

Nous nous attacherons, dans la suite de ce chapitre, à décrire les résultats préliminaires que nous avons obtenu chez un primate lors d'enregistrements couplés entre le fUS et l'électrophysiologie.

5.2. Matériel et méthodes

Le matériel et méthode est similaire aux chapitres précédents et ne sera pas rapporté ici. Seule la partie sur l'ajout de l'électrophysiologie sera ajoutée.

Enregistrement électrophysiologique

Une microélectrode de tungstène (FHC, Bowdoin, USA) de 120 mm de long pour 100 μm de diamètre est descendue à l'aide d'un micro descenseur dans le cerveau du singe et reliée à un pré-amplificateur. Les données sont acquises à l'aide d'une interface Plexon (Plexon Inc., USA) et échantillonnées à 40 kHz pour les décharges neuronales et à 1 kHz pour les PCL. Pour limiter les interférences électromagnétiques entre l'environnement extérieur et le système d'enregistrement, la tête du singe est enfermée dans une cage de Faraday trouée pour ne pas gêner le regard.

5.3. Résultats préliminaires

5.3.1. Localisation *in vivo* de la pointe de la microélectrode

Comme nous l'avons vu dans le chapitre d'introduction, l'imagerie Doppler est sensible aux mouvements, et nous permet de visualiser les vaisseaux sanguins à l'aide du mouvement des globules rouges. De la même manière, une microélectrode descendue dans le cerveau possède un mouvement lent (de l'ordre de la dizaine de micromètres par seconde) et rectiligne. Ce mouvement, s'il traverse notre champ d'imagerie, est donc visible à l'imagerie ultrasonore, moyennant une modification du filtre spatiotemporel SVD.

En réglant ce filtre sur $N = 2$ valeurs singulières omises (au lieu de $N = 30$ valeurs singulières pour l'imagerie des vaisseaux sanguins), nous pouvons imager directement l'insertion de la microélectrode dans le cerveau des primates.

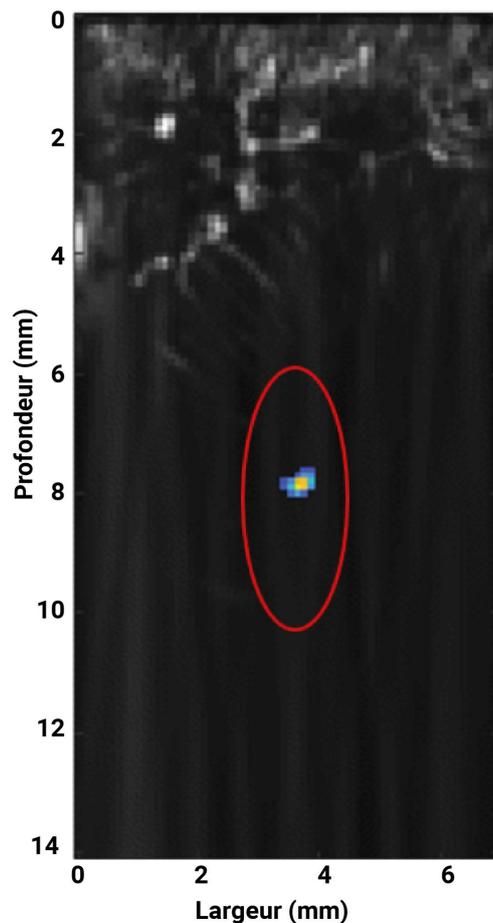


Figure 93. Exemple de localisation de la pointe d'une microélectrode dans le cerveau d'un primate vigile. En niveau de gris : anatomie vasculaire, en couleur : localisation de la pointe de la microélectrode en mouvement à l'aide du filtrage spatiotemporel. Ovale rouge : lieu de la localisation spatiale de la microélectrode tel qu'observée par imagerie ultrasonore.

5.3.2. Enregistrements couplés fUS / électrophysiologie

Une fois que l'électrode est positionnée dans le cerveau, nous sommes capables d'enregistrer l'activité neuronale et vasculaire de concert. Notre capacité à enregistrer l'activité neuronale est bien sur directement dépendante du neurone que nous enregistrons, et toutes les sessions ne se valent pas. Nous présentons ici un exemple sur un neurone réagissant aux antisaccades à droite (Figure 94) et nous le comparons à l'activité vasculaire dans les COS tel que cette zone est définie dans nos précédents chapitres

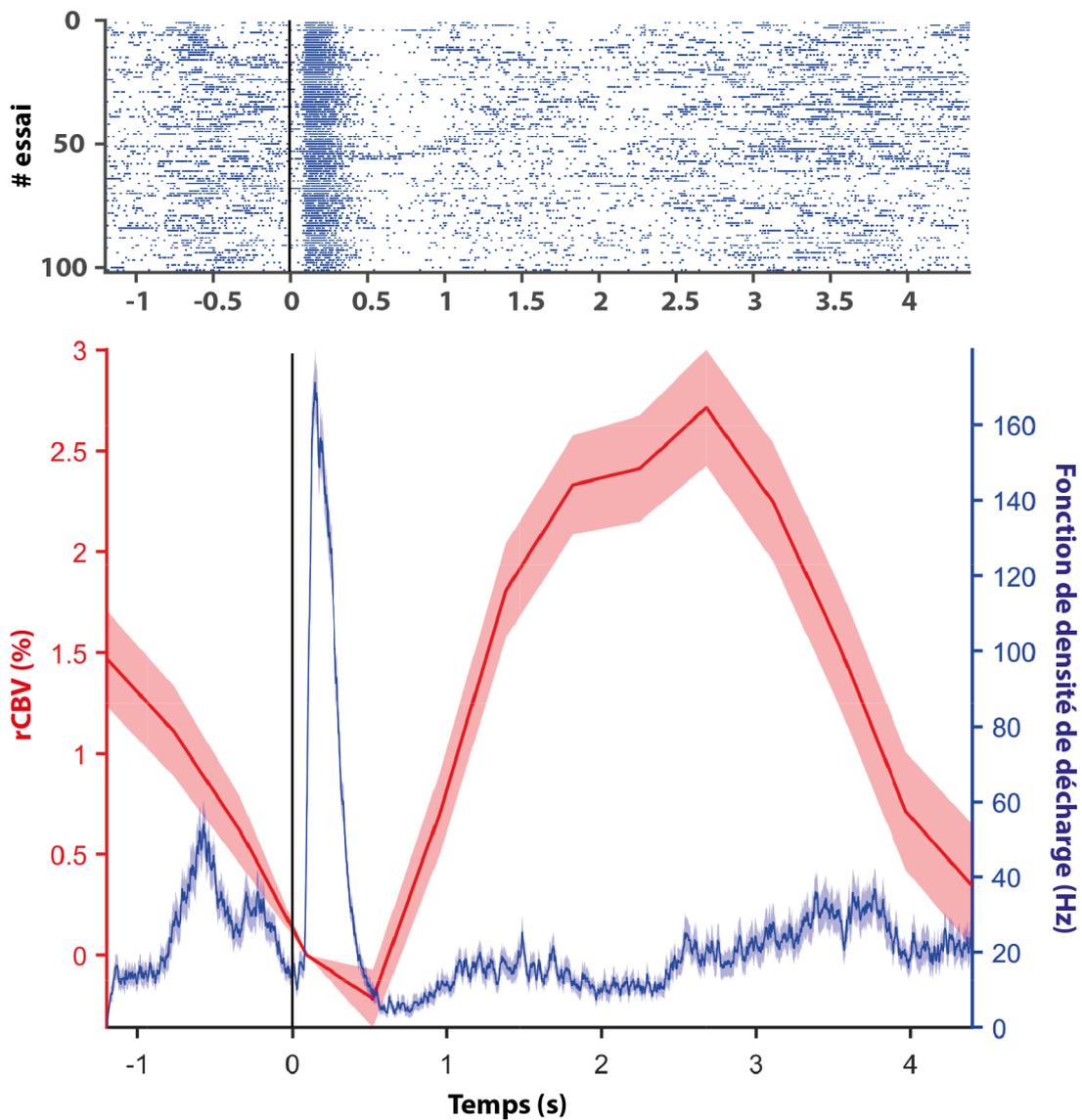


Figure 94. Exemple d'enregistrement couplés entre le fUS et l'électrophysiologie pour une séance concernant les antisaccades à droite. (a) *Raster plot* de l'activité neuronale pour la tâche de saccade, chaque point bleu correspondant à la détection d'une décharge neuronale (b) Superposition de l'activité neuronale, en fonction de densité de décharge (bleu, droite) avec un maximum vers 40 Hz à env. 170 ms après la présentation de l'indice de saccade et l'activité vasculaire dans le COS (rouge, gauche). Le VSC dans le COS atteint son maximum à 1,8 secondes à 3% de Δ VSC pour cet exemple.

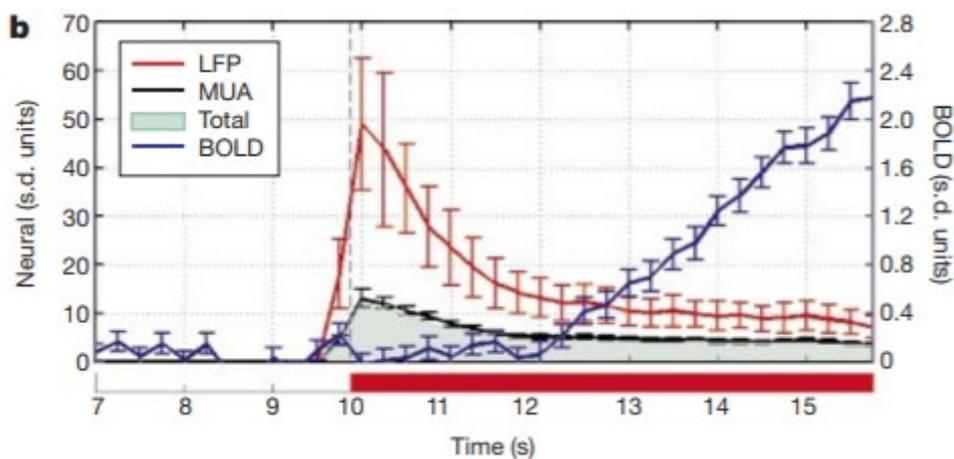
Nous remarquons que l'activité neuronale est rapide, avec un début environ 100 ms après la présentation de l'indice permettant la saccade, et un maximum, pour cet exemple, à 172 ms (38 Hz de fréquence maximale de décharge) et un retour à la ligne de base qui est lui aussi très rapide, 300 ms après le pic du maximum. Au contraire, l'activité vasculaire est particulièrement lente par rapport à l'activité neuronale, avec un seuil de

déteçtabilité d'environ 1 seconde et un maximum à 1,8 secondes (avec $\Delta VSC = 3\%$) et un retour à la ligne de base prenant plus de 4 secondes (ce qui est cohérent avec la réponse hémodynamique que nous avons déterminé plus tôt).

5.3.3. Découplage neurovasculaire entre la tâche et l'activité fUS.

En 2001, N. Logothetis lie l'activité des potentiels de champs locaux (PCL) à l'activité BOLD en utilisant des mesures couplées entre l'électrophysiologie et l'IRM dans le cerveau de primates non-humain.

Figure 95. Couplage entre l'activité des PCL (en rouge), de l'activité de multiples



neurones (en noir) et l'activité BOLD mesuré par IRM (en bleu) dans le cortex visuel de primates anesthésiés. D'après N. Logothetis *et al.*, 2001.

Il montre que l'activité BOLD, telle que mesurée dans le cortex visuel de primates anesthésiés (ou, nous pouvons supposer, plus généralement dans une aire sensorielle primaire) est, de manière robuste, prédite par l'activité des PCL (voir Figure 95) mesurée par électrophysiologie. Il montre notamment que les potentiels de champs locaux sont un bien meilleur indicateur pour les stimuli très longs de l'activité vasculaire BOLD induite que ne le sont l'activité de neurones multiples (ANM), ceux-ci semblant retourner à une ligne de base bien avant que les PCL ne le fassent (voir Figure 91.)

Cependant, l'étude de N. Logothetis se heurte à plusieurs limitations, notamment de l'acquisition IRM. En effet, pour obtenir un signal sortant du bruit, il est nécessaire de moyennner un grand nombre d'essais. Ceci rend l'étude sur un essai unique impossible contrairement à ce que nous avons pu réaliser avec le fUS. En répétant les stimulations, il devient possible de voir d'observer des modifications de la réponse sur des temps longs

(de l'ordre de l'heure et plus). Par ailleurs, il est généralement plus facile de réaliser cette expérimentation chez un primate anesthésié, impliquant généralement que cette étude soit faite dans une aire sensorielle primaire telle que le cortex visuel.

Le fUS nous permet de nous affranchir de ces limitations en effectuant ces études chez un primate éveillé réalisant une tâche cognitive et avec un rapport signal-à-bruit nous permettant de nous affranchir de moyenniser le signal temporel pour obtenir une mesure du ΔVSC . Ainsi, nous avons pu nous rendre compte de possibles variations dans le signal Doppler et étudier ses corrélations avec le signal des PCL ou celui des ANM. Nous allons désormais nous attacher à étudier le lien temporel sur des temps longs entre le fUS et l'activité neuronale mesurée par électrophysiologie.

Comme nous l'avons décrit au Chapitre 3, nous observons, dans le signal fUS, une diminution de ce dernier au cours du temps (sur une échelle de temps de l'ordre de l'heure) que nous avons liée à la motivation, par la corrélation établie avec la pupille. Il est intéressant de se demander, dans le même esprit que l'étude de N. Logothetis, ce qui se passe entre les PCL, les ANM et l'AUN et le signal fUS sur la même échelle de temps. Pour effectuer cette étude, il nous faut commencer par définir comment nous définissons la fréquence de décharge (en Hz) pour un seul essai. Pour ce faire, nous effectuons le calcul de la fréquence de décharge pour chaque saccade ou antisaccade individuelle (en fonction de la nature du neurone que nous enregistrons, certains répondant à une tâche mais pas forcément à une autre) et nous prenons le maximum de la fréquence de décharge obtenue (pour un neurone unique, celle-ci sera autour de 100 à 150 Hz, pour de multiples neurones, la fréquence pourra atteindre, comme nous le verrons, plus de 400 Hz, indiquant clairement la présence d'un grand nombre de neurones dans l'enregistrement). De même, pour les PCL, nous prenons le minimum du pic négatif des LFP individuels (recalés sur le même évènement que celui choisi précédemment).

Notons qu'il n'est pas facile de déterminer si un enregistrement est un neurone unique ou la somme de plusieurs neurones, rendant plutôt difficile le « *spike sorting* » même si celui-ci est fait directement pendant l'enregistrement. Au contraire des signaux AUN et ANM ceux des PCL sont indépendants du *sorting* de nos neurones, et peuvent être donc un indicateur plus stable des grandeurs que nous cherchons à mesurer.

Au sein des populations neuronales que nous avons enregistrées, nous observons alors deux types de comportements :

- Le premier, tel que décrit dans la Figure 96, montre un découplage partiel : l'activité de multiples neurones semble suivre l'activité fUS au cours du temps (gauche) alors que l'activité des PCL elle ne semble pas décroître. Cette activité décroissante peut-être due à une perte du signal des neurones, mais aussi à la nature des neurones mesurés, que nous pouvons imaginer être nombreux (car la fréquence maximale en début de tâche est de l'ordre de 400 Hz, ce qui indique que plusieurs neurones sont présents dans les ANM).

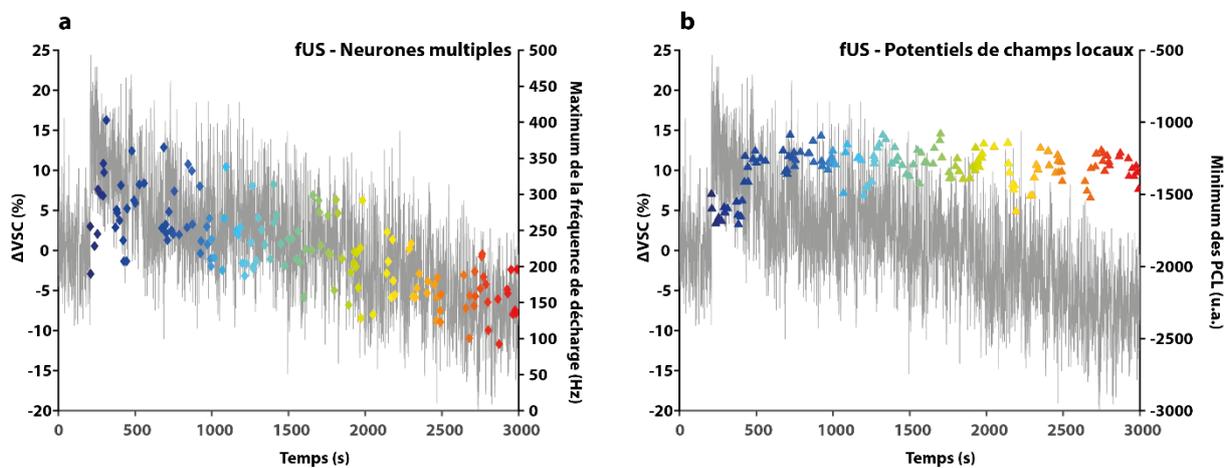


Figure 96. L'activité des ANM et les PCL au cours d'une session, exemple d'une unique session (a) pendant laquelle l'activité de neurones multiples semble décroître au cours du temps (diamant, gauche) (b) alors que l'activité des PCL semble constante au cours du temps (triangle, droite). Le code couleur indique la position de l'essai (bleu : début de la tâche, rouge : fin de la tâche.). Le signal fUS est représenté en gris.

- Le second cas, comme présenté en Figure 97, montre un découplage complet : il peut donc exister un découplage neurovasculaire entre l'activité AUN, ANM et PCL et l'activité vasculaire, puisque nous ne semblons, cette fois, pas observer de diminution de l'activité neuronale au cours du temps tandis que l'activité vasculaire chute au cours de l'enregistrement.

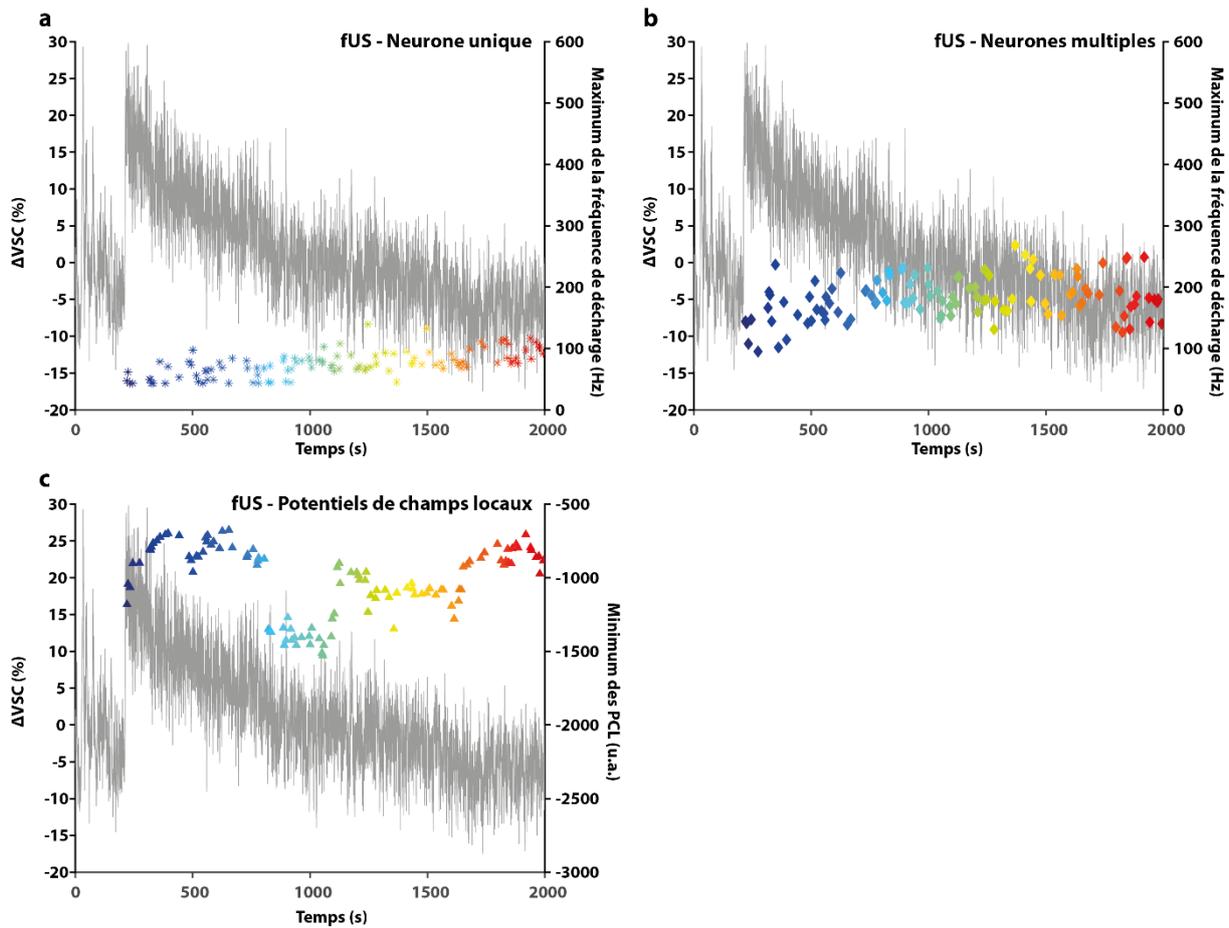


Figure 97. Exemple d'une session où nous observons un potentiel découplage neurovasculaire. (a) Activité d'un unique neurone (étoiles) et l'activité fUS (gris), le code couleur étant bleu : début de tâche, rouge : fin de tâche. (b) Activité de multiples neurones (diamants) et fUS (gris), même code couleur que précédemment (c) Minimum des PCL (triangle) et signal fUS (gris), même code couleur que précédemment.

En conclusion de cette partie sur l'investigation d'un potentiel découplage neurovasculaire, **nous pouvons imaginer que le couplage neurovasculaire est très probablement bien plus complexe que celui décrit par N. Logothetis chez le primate anesthésié dans une aire sensorielle primaire.** Celui-ci pourrait dépendre fortement de la nature des neurones mesurés et de la zone que nous désirons étudier, mais aussi d'interactions gliales entre l'activité des neurones et l'activité vasculaire. Nous nous demandons si les PCL sont, dans notre cas, un bon prédicteur de l'activité vasculaire ou s'il existe des interactions bien plus complexes qu'il faudrait prendre en compte pour avoir un prédicteur robuste de l'activité vasculaire à partir de l'activité électrique dans la région que nous étudions. De plus amples investigations de ce phénomène sont en cours au laboratoire.

5.4. Discussion et conclusion

Similairement aux données décrites dans la littérature pour le couplage entre l'IRM fonctionnelle et l'électrophysiologie¹⁰, nous sommes capables de mesurer, de manière simultanée, l'activité neuronale et l'électrophysiologie, mais cette fois chez le primate éveillé réalisant une tâche oculomotrice, et ce dans les centres supérieurs de la cognition.

Notre technique présente deux avantages majeurs par rapport à l'imagerie IRM : nous sommes capables de le faire facilement chez le primate éveillé, et nous n'observons pas ou peu d'interactions électromagnétiques entre la sonde ultrasonore et les microélectrodes. Elle présente cependant un désavantage majeur : elle n'est capable d'imager qu'un seul plan en temps réel, et ne permet pas d'avoir accès à la totalité de l'activité cérébrale à un temps donnée. Ce désavantage est néanmoins à tempérer, en effet, nous sommes aptes, en temps réel, de localiser l'électrode dans le cerveau, et ce avec une résolution typique de l'ordre de la centaine de micromètres, ce qui nous permet de nous assurer que nous imageons bien dans un plan donné tant le fUS que l'électrophysiologie. N'utilisant pas plusieurs électrodes pour enregistrer l'activité corticale dans plusieurs endroits du cerveau, l'accès à un volume 3D cortical est donc d'intérêt limité pour notre étude, rendant la technique des ultrasons fonctionnels particulièrement adaptés.

Similairement, en utilisant des microsenseurs en fibres de carbones recouvertes de platine¹³, permettant un suivi *in vivo* de différentes grandeurs biologique (pO_2 , [glucose], [lactate], etc.) nous allons être capable de réaliser l'enregistrement conjoint tant de concentration biologiques en neurotransmetteurs (e.g. [glycine], [glutamate]), de la concentration locale en oxygène (pO_2) ou encore de la concentration en nutriments ([glucose], [lactate]) et de coupler ces grandeurs avec l'activité neuronale et l'activité vasculaire dans le COS et dans le CCA. Ces perspectives de travaux à venir ouvrent un grand champ des possibles sur les études que nous allons pouvoir effectuer et, nous l'espérons, dans notre compréhension plus fine des mécanismes du couplage neuro-vasculaire.

5.5. Bibliographie du chapitre

1. Bruce, C. J. & Goldberg, M. E. Primate frontal eye fields. I. Single neurons discharging before saccades. *J. Neurophysiol.* **53**, 603–635 (1985).
2. Goldberg, M. & Wurtz, R. H. Activity of superior colliculus in behaving monkey. I. Visual receptive fields of single neurons. *J. Neurophysiol.* **35**, 542–59 (1972).
3. Logothetis, N. K., Guggenberger, H., Peled, S. & Pauls, J. Functional imaging of the monkey brain. *Nat. Neurosci.* **2**, 555–562 (1999).
4. Shmuel, A., Augath, M., Oeltermann, A. & Logothetis, N. K. Negative functional MRI response correlates with decreases in neuronal activity in monkey visual area V1. *Nat. Neurosci.* **9**, 569–577 (2006).
5. Srihasam, K., Sullivan, K., Savage, T. & Livingstone, M. S. Non-invasive functional MRI in alert monkeys. *NeuroImage* **51**, 267–273 (2010).
6. Goense, J. B. M. & Logothetis, N. K. Neurophysiology of the BOLD fMRI Signal in Awake Monkeys. *Curr. Biol.* **18**, 631–640 (2008).
7. Orban, G. A. Functional MRI in the Awake Monkey: The Missing Link. *J. Cogn. Neurosci.* **14**, 965–969 (2002).
8. Dizeux, A. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates. *Nat. Commun.* **10**, 1–9 (2019).
9. Blaize, K. *et al.* Functional ultrasound imaging of deep visual cortex in awake nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 14453–14463 (2020).
10. Logothetis, N. K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T. & Oeltermann, A. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* **412**, 150–157 (2001).

11. Aydin, A.-K. *et al.* Transfer functions linking neural calcium to single voxel functional ultrasound signal. *Nat. Commun.* **11**, 2954 (2020).
12. Nelson, M. J., Bosch, C., Venance, L. & Pouget, P. Microscale Inhomogeneity of Brain Tissue Distorts Electrical Signal Propagation. *J. Neurosci.* **33**, 2821–2827 (2013).
13. Chatard, C., Sabac, A., Moreno-Velasquez, L., Meiller, A. & Marinesco, S. Minimally Invasive Microelectrode Biosensors Based on Platinized Carbon Fibers for in Vivo Brain Monitoring. *ACS Cent. Sci.* **4**, 1751–1760 (2018).

Chapitre 6. Conclusion générale

Ces travaux de recherches ont permis, nous l'espérons, d'étendre le champ des connaissances sur le système nerveux central à l'aide de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore. L'étude des entrées dans le système nerveux central, lieu à la fois de l'intégration de messages de bas niveau comme la nociception mais aussi le lieu de fonctions cognitives supérieures comme le suivi de la réussite d'une tâche et/ou de la volonté, furent le fil conducteur de cette thèse.

Pour commencer, nous nous sommes intéressés au mécanisme le plus bas niveau présent dans cette thèse : l'intégration par la moelle épinière de l'information nociceptive. Celle-ci étant le premier lieu de l'intégration de l'information dans la chaîne des événements conduisant à la sensation de douleur, nous nous sommes penchés sur notre capacité d'imager cette dernière à l'aide de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore. Grâce au fUS, nous avons montré qu'il est possible d'imager de manière dynamique les activations neurovasculaires locales de la moelle épinière lors de stimulations tactiles de la patte, non douloureuses, mais aussi avec des stimulations mécaniques au-dessus du seuil de douleur. Par ailleurs, et dans un souci de raffinement, nous avons cherché à stimuler de manière plus précise et calibrée les différents groupes de fibres en utilisant des stimulations électriques. Nous suggérons, avec les résultats obtenus de ces stimulations, que les fibres $A\delta$ et C induisent une réponse hémodynamique de plus grande amplitude que les stimulations des fibres $A\beta$. Par ailleurs, nous pensons que le mécanisme de couplage neurovasculaire est NMDA-dépendant, un blocage sélectif des récepteurs NMDA ne donnant plus de réponse mesurable pour une intensité de stimulation donnant, avant application du bloqueur, une réponse forte. Finalement, nous montrons dans cette étude qu'une inflammation périphérique induit une sensibilisation à la douleur se caractérisant par une modification de la réponse neurovasculaire au sein de la moelle épinière, induisant une augmentation de l'intensité de réponse pour un même stimulus.

Après avoir étudié avec intérêt le couplage neurovasculaire chez le rat, nous nous sommes intéressés à un autre modèle d'étude, le macaque rhésus, afin d'aborder le domaine de la cognition. Le macaque rhésus est capable d'apprendre une tâche cognitive complexe et de l'effectuer, rendant possible l'imagerie fonctionnelle ultrasonore chez cet animal durant une tâche. En enregistrant, durant une tâche de saccades, l'activité neurovasculaire dans un plan contenant, entre autres, les champs oculomoteurs supplémentaires, nous montrons que nous sommes capables, sans *a priori*, de corrélérer

l'activité de ces derniers avec l'activité de la pupille, connue pour être le reflet de l'engagement cognitif dans une tâche cognitive. Nous suggérons par ailleurs que la réponse neurovasculaire et la réponse pupillaire ne se passent pas au même moment dans le cerveau et que si nous compensons le décalage dû à la lenteur relative de la réponse hémodynamique par rapport à la réponse pupillaire, la réponse pupillaire arrive après la réponse hémodynamique, suggérant que le système pupillaire répond après les COS dans notre tâche cognitive. Par ailleurs, nous montrons qu'une modulation directe de la récompense permet de changer l'activité dans les champs oculomoteurs supplémentaires mais aussi dans l'activité de la pupille, renforçant le lien fort entre la pupille et les COS et proposant un rôle, jusqu'à lors inconnu, des COS dans le maintien et le suivi de l'effort cognitif chez le primate non-humain.

Par pure sérendipité, nous avons ensuite réussi à imager, dans le cortex cingulaire antérieur présent dans notre plan d'imagerie, un marqueur cérébral de la volonté chez le primate non-humain. En effet, la tâche cognitive à laquelle sont soumis nos macaques n'est pas de tout repos et il arrive que ceux-ci fassent des pauses plus ou moins longues. Nous nous sommes rendus compte, vers la fin de ces pauses, d'un signal vasculaire fort précédant la reprise du travail, quelques secondes avant la reprise effective. En comparant ce signal que nous nommons « volontaire » par opposition au signal « induit » au début de la tâche, quand nous présentons pour la première fois après la ligne de base le premier point de fixation, nous avons été capables de quantifier pour la première fois ce que nous appelons « volonté de la reprise du travail » chez nos primates, dans la libre-disposition d'eux-mêmes. Ces résultats ne sont, à l'heure de ce manuscrit, présents que chez un primate, le second étant en cours d'enregistrement.

Finalement, nous nous intéressons, encore au moment de l'écriture de ce manuscrit, au couplage entre l'imagerie fonctionnelle ultrasonore et d'autres modalités d'exploration de l'activité neuronale comme l'électrophysiologie. Nous montrons, dans ce manuscrit, qu'il est possible de coupler l'imagerie Doppler avec l'électrophysiologie chez le primate et donc d'avoir accès en même temps à un marqueur direct de l'activité neuronale et à un marqueur indirect de celle-ci. Il sera intéressant, pour la suite, de s'intéresser plus finement au lien entre activité neuronale et activité vasculaire, notamment à l'aide de micro-capteurs biochimiques nous permettant de mesurer la concentration locale en différentes espèces de neurotransmetteurs ou de marqueurs métaboliques au sein de la manière corticale.

Nous espérons que ces travaux et les perspectives qu'ils dévoilent permettent de mieux appréhender le fonctionnement du système nerveux central et montrent que l'imagerie fonctionnelle ultrasonore peut être un outil innovant pour imager tant des mécanismes de bas niveau cortical comme l'intégration par la moelle épinière de l'information nociceptive que des mécanismes de très haut niveau de contrôle cortical tel que la volonté.

Communications scientifiques

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

“Neuronavigated repetitive transcranial ultrasound stimulation induces long-lasting and reversible effects on oculomotor performance in non-human primates”

*P. Pouget, S. Frey, H. Ahnine, D. Attali, **J. Claron**, C. Constant & J.F. Aubry*

Frontiers in Physiology, 2020

“Ultrafast ultrasound imaging pattern analysis reveals distinctive dynamic brain states and potent sub-network alterations in arthritic animals”

*L. Rahal, M. Thibaut, I. Rivals, **J. Claron**, Z. Lenkei, J.D. Sitt, M. Tanter & S. Pezet*

Nature Scientific Report, 2020

“Large scale functional ultrasound imaging of the spinal cord reveals in-depth spatiotemporal responses of spinal nociceptive circuits in both normal and inflammatory states”

***J. Claron**, V. Hingot, I. Rivals, L. Rahal, O. Couture, T. Deffieux, M. Tanter & S. Pezet*

Pain, 2021 (accepté, en attente de publication)

Articles en cours d'écriture

“The supplementary eye-field tracks cognitive efforts”

***J. Claron**, J. Royo, F. Arcizet, T. Deffieux, M. Tanter & P. Pouget*

“Anterior cingulate cortex drives the Will in FreeWill movement initiation”

J. Claron, C. Galéa, J. Royo, F. Arcizet, Q. Welniarz, T. Deffieux, M. Tanter & P. Pouget

Présentation orale en conférences scientifiques

* : orateur

ESMI 2020 – European Society for Molecular Imaging – Virtual conference

“Investigation on neurophysiological origin of functional ultrasound signal by electrophysiology and ultrafast ultrasound imaging”

*J. Claron**, *T. Deffieux, M. Tanter & P. Pouget*

Présentations de poster en conférences scientifiques

SfN Global Connectome 2021 – Society for Neurosciences

“Functional ultrasound and electrophysiological recording of awake and behaving monkey’s pre-motor cortex”

*J. Claron**, *F. Arcizet, T. Deffieux, M. Tanter & P. Pouget*

International Workshop on functional ultrasound imaging of the brain – 2019, Cargèse, France

“Coupled functional ultrasound and electrophysiological recording in awake behaving monkeys”

*J. Claron**, *T. Deffieux, P. Pouget & M. Tanter*

Society for Neurosciences – 49th annual meeting (San Diego, California, USA)

“Large scale functional imaging of the spinal cord reveals in depth spatiotemporal responses of spinal noniceptive circuits in both normal and inflammatory state”

J. Claron*, *V. Hingot*, *I. Rivals*, *L. Rahal*, *O. Couture*, *T. Deffieux*, *M. Tanter* & *S. Pezet*

Large-scale functional ultrasound imaging of the spinal cord reveals in-depth spatiotemporal responses of spinal nociceptive circuits in both normal and inflammatory states

Julien Claron^{a,b}, Vincent Hingot^b, Isabelle Rivals^c, Line Rahal^{a,b}, Olivier Couture^b, Thomas Deffieux^b, Mickael Tanter^b, Sophie Pezet^{a,b,*}

Abstract

Despite a century of research on the physiology/pathophysiology of the spinal cord in chronic pain condition, the properties of the spinal cord were rarely studied at the large-scale level from a neurovascular point of view. This is mostly due to the limited spatial and/or temporal resolution of the available techniques. Functional ultrasound imaging (fUS) is an emerging neuroimaging approach that allows, through the measurement of cerebral blood volume, the study of brain functional connectivity or functional activations with excellent spatial (100 μm) and temporal (1 msec) resolutions and a high sensitivity. The aim of this study was to increase our understanding of the spinal cord physiology through the study of the properties of spinal hemodynamic response to the natural or electrical stimulation of afferent fibers. Using a combination of fUS and ultrasound localization microscopy, the first step of this study was the fine description of the vascular structures in the rat spinal cord. Then, using either natural or electrical stimulations of different categories of afferent fibers (A β , A δ , and C fibers), we could define the characteristics of the typical hemodynamic response of the rat spinal cord experimentally. We showed that the responses are fiber-specific, located ipsilaterally in the dorsal horn, and that they follow the somatotopy of afferent fiber entries in the dorsal horn and that the C-fiber response is an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. Finally, fUS imaging of the mesoscopic hemodynamic response induced by natural tactile stimulations revealed a potentiated response in inflammatory condition, suggesting an enhanced response to allodynic stimulations.

Keywords: Pain, fUS, Neurovascular, Plasticity, NMDA

1. Introduction

The spinal dorsal horn is the first site of integration of multiple sensory modalities and their modulation. Most of our knowledge on the physiology and physiopathology of the spinal cord comes from electrophysiological and histological studies. Extracellular recordings produced invaluable information regarding the neuronal electrophysiological properties in health and disease, through peripheral stimulations of the neurons' receptive field. They evidenced the increased neuronal firing, as well as the

involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent mechanisms underlying central sensitization associated with persistent pain,³⁸ shedding light on the mechanisms of action of ketamine in the clinical manifestations of central sensitization.^{15,19} Neuroanatomical studies, however, helped understand the role of intracellular signaling pathways in central sensitization and the nature and role of subtypes of excitatory and inhibitory neurons in the various laminae of the dorsal horn.⁸⁰

All these techniques have their strengths and weaknesses. Ultimately, a technique that would have excellent temporal and spatial resolutions, and high sensitivity, enabling measurements at the cellular level and in a large field of view, would be perfect. Electrophysiological and optical imaging²⁷ studies only allow recordings in a very narrow space. Neuroimaging techniques, such as functional MRI, by contrast, image with a large field of view, but due to the small size of the spinal cord in rodents, it requires high magnetic fields and long exposure times to visualize the spinal cord, with sometimes a poor spatiotemporal resolution. For all these reasons, and due to the breathing-related motion artefacts,¹² there are significantly fewer neuroimaging studies performed in humans^{7,9,13,53,67,68,70–72} and rodents' spinal cord^{39,43,46–48,56,90,91} than in the brain.

Functional ultrasound (fUS) imaging is a relatively new versatile neuroimaging approach that allows imaging and measurement of cerebral blood volume in human neonates,¹⁶ in adult intraoperative settings,³² nonhuman primates,²⁰ anesthetized^{18,45} and freely moving rodents^{3,63,83} with excellent spatial and temporal resolutions.

Mickael Tanter and Sophie Pezet directed this work equally.

^a Laboratory of Brain Plasticity, ESPCI Paris, PSL Research University, CNRS UMR 8249, Paris, France, ^b Physics for Medicine Paris, Inserm, ESPCI Paris, CNRS, PSL Research, University, Paris, France, ^c Equipe de Statistique Appliquée, ESPCI Paris, PSL Research University, CNRS UMRS 1158, Paris, France

*Corresponding author. Address: Laboratory "Physic for Medicine," ESPCI, Inserm U1273, CNRS FRE 2031, 17 rue Moreau, 75012 Paris, France. Tel: +33 1 40 96 30 74. E-mail address: sophie.pezet@espci.fr (S. Pezet).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.painjournalonline.com).

PAIN 00 (2020) 1–13

Copyright © 2020 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the International Association for the Study of Pain. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002078>

Due to the existence of a neurovascular coupling, an increased local neuronal activity induces a hemodynamic response.³¹ Functional ultrasound imaging is sensitive enough to measure the cortical hemodynamic changes induced by olfactory,⁵⁵ visual,²⁵ and auditory⁵ stimuli in anesthetized animals. The use of such a technique in the spinal cord, in the context of a better understanding of the physiology of the spinal cord in sensory integration, would be very valuable. Recent studies have shown as first proofs of concept that fUS imaging is an emerging modality of neuroimaging in the rodent spinal cord, in particular in the context of spinal cord lesions and its restoration.^{35,65,66}

Our study aimed at (1) a detailed imaging of the vascular structures of the rat spinal cord by combining both fUS imaging and ultrasound localization microscopy (ULM), which increases even further the spatial resolution (10 μm),²³ (2) evaluating the sensitivity of this fUS technique to image the spinal neurovascular response to natural (noxious or innocuous) peripheral stimuli, (3) determining the typical hemodynamic response function (HRF), and (4) imaging their alterations due to the central sensitization induced by short-term inflammatory pain.

2. Material and method

2.1. Animals

All experiments were performed in agreement with the European Community Council Directive of 22 September 2010 (010/63/UE) and the local ethics committee (*Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale* number 59, "Paris Centre et Sud," project 2018-05). Accordingly, the number of animals in our study was kept to the necessary minimum. Experiments were performed on $N = 51$ male Sprague-Dawley rats (Janvier Labs; Le Genest St Isle, France), weighing 325 to 350 g at the beginning of the experiments. Animals (2 per cage) arrived in the laboratory 1 week before the beginning of the experiment and were kept at a constant temperature of 22°C, with a 12-hour alternating light/dark cycle. Food and water were available ad libitum.

2.1.1. In toto coloration of spinal cord vascular architecture

After an imaging session, $N = 3$ Sprague-Dawley rats were deeply anesthetized with an intraperitoneal (IP) injection of sodium pentobarbital (150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Then, a thoracotomy was performed and an incision in the right atrium was made. Animals were perfused with 2 mL of saline solution (NaCl 0.9%), followed immediately by 15 mL of Dil (0.012 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 2% ethanol, 98% PBS [phosphate buffered saline] solution, 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), as previously described⁴² and then 10 mL of paraformaldehyde 4% at the rate of 7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Spinal cords were extracted and fixed for 2 days in 4% paraformaldehyde at 4°C before cryoprotection in a 30% sucrose solution for 2 days. Spinal cords were frozen in an OCT matrix (optimal cutting temperature compound) in cooled isopentane (-40°C) on dry ice, cut in 50 μm slices using "free-floating" method in PBS, and positioned on Superfrost slides. Mosaic images were immediately acquired using Axio Imager M1 (Zeiss, Jena, Germany).

2.1.2. Laminectomy and spinal functional ultrasound imaging

Under deep anesthesia (intraperitoneal [IP] bolus of medetomidine [Domitor, 0.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] and ketamine [Imalgène, 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]), a laminectomy was performed between the 12th thoracic vertebra

and the second lumbar vertebra. This window allowed the positioning of the whole ultrasonic probe (14 mm) in a sagittal plane.

Once the laminectomy performed, the animal was placed on a "spinal cord" stereotaxic frame, where the lumbar rachis was suspended. Lidocaine (Xylovet, Ceva, France, 2 mg/mL) was topically applied on the muscles that were exposed, as well as the insertion points of the spinal holders. The anesthesia was maintained but reduced, using subcutaneous perfusion at the rate of medetomidine (0.1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{h}$) and ketamine (12.5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{h}$) using a syringe pump. To obtain reproducible results, it was necessary to wait approximately 1h30 after induction before imaging to obtain a stable and light level of anesthesia (respiratory frequency around 120 bpm). During the surgical procedure and the imaging session, the animal's body temperature was kept at 37°C using a heating blanket and an intrarectal probe (Physitemp, Clifton, NJ), and the heart and respiratory frequencies were monitored (MouseOxPlus, Ugo Basile, Italy). Each imaging session lasted from 4 to 6 hours.

Two milliliters of saline was gently dropped on the spinal cord (the dura mater was kept intact), and the cavity made by the laminectomy was then filled with echographic gel. The ultrasonic probe ($f = 15$ MHz, 128 elements, Vermon, Tours, France) was then positioned just above the window using a 3-axis motor system on which the ultrasound probe was fixed. The probe connected to an ultrasonic ultrafast scanner (Verasonics, Kirkland, WA: 128 channels, 62.5 MHz sampling rate) was driven with Neuroscan live acquisition software (Iconeus, Paris, France; and Inserm Accelerator of Technological Research in Biomedical Ultrasound, Paris, France).

2.1.3. Peripheral stimulations

2.1.3.1. Mechanical stimulations

Twenty-four hours before the imaging session, the threshold of nociceptive mechanical sensitivity was determined using calibrated forceps (Bioseb, France), as previously described,^{76–78} by applying an increasing pressure on the foot pad of the hind paw in awake and habituated animals. This nociceptive threshold (withdrawal threshold >4.5 N) was further used in imaging sessions to apply the necessary force to elicit a nociceptive mechanical stimulation.

2.1.3.2. Electrical stimulations

A low-frequency generator (A310 Accupulser, World Precision Instruments, Hitchin, United Kingdom) was used with a current generator (Digitimer, DS3; Letchworth Garden City, United Kingdom) to generate a waveform (2 msec width, 40 Hz stimulation for 5 seconds) for subcutaneous hind paw stimulation using acupuncture needles. To stimulate different groups of fibers, we chose different intensities: supramaximal stimulation of C fibers required stimulation at 3 mA for C fibers, 1.5 mA for A δ fibers, and 0.5 mA for A β fibers. These parameters were chosen according to previous literature.^{10,40,64} During the sets of experiments, the stimulation patterns were randomized. Also, to avoid any spinal hyperexcitability induced by repetitive stimulation of C fibers,⁵¹ only a maximal number of 8 acquisitions at 3 mA were performed on each animal.

For the determination of the spinal HRF, a high-intensity and short-duration⁶⁰ (5 mA, 2 seconds) waveform at 40 Hz was used. The waveform was triggered by the ultrafast imager. We chose the shortest duration inducing a strong and reproducible response.

2.2. Functional ultrasound imaging: sequences of imaging and signal processing

2.2.1. Sequences of imaging

Functional ultrasound imaging was performed using a linear ultrasound probe (128 elements, 15 MHz, 110 μm pitch, 8 mm elevation focus, Vermon) driven by an ultrafast ultrasound scanner (Verasonics, 128 channels, 62.5 MHz sampling rate), which was driven with Neuroscan live acquisition software (Iconeus, Paris, France; and Inserm Accelerator of Technological Research in Biomedical Ultrasound, Paris, France). The fUS imaging sequence operated as follows: the spinal cord was insonified by 10 successive tilted plane waves with angles varying from -10° to 10° with a 5.5-kHz pulse repetition frequency. The backscattered echoes were recorded by the transducer array and beamformed to produce a block of 200 consecutive ultrafast images with a framerate of 500 Hz. Each block acquisition was followed by a pause up to 600 ms for data treatment. To filter the spinal blood volume (SBV) and remove the tissue signal, we used a clutter filter based on singular value decomposition (SVD) algorithm applied to 200 successive frames¹⁷ by removing the 60 first singular vectors that correspond mainly to the tissue space. Finally, a Power Doppler image was obtained by integrating the energy of the filtered frames, resulting in a Power Doppler image every 400 ms or 1 second depending on the pause.

Note that no additional motion correction was necessary because the lumbar spinal cord was tightened and suspended using spinal holders and the aforementioned SVD clutter filter can remove residual tissue motion.

2.2.2. Two planes were chosen for imaging

A sagittal plane and a transverse one were chosen. For the placement of the sagittal plane, we made several scans in the transverse direction and we chose the middle of the spinal cord by recognizing specific structures. Once at the midline, the probe was moved 500 μm towards the ipsilateral side of the simulation. Therefore, the functional studies in the sagittal plane were performed at 500 μm laterality in the ipsilateral side. For the top-down positioning, the image was centered on the lumbar enlargement.

For the transverse positioning, a preliminary positive stimulation test was made on the sagittal plane before rotating the probe with the 3 axis motors on the area highlighted by preliminary acquisition.

Experiments of functional activation in the transverse plane were difficult to perform because it is easy to miss the responsive area in the cord (slice thickness is about 400 μm). Also, within this plane, the position of the vertebra and the ribs induce artifactual reverberations, causing a high level of background noise compared to the sagittal plane. This is probably due to a difference in wave scattering in the intervertebral space that is different between the sagittal plane and the transverse plane. These are the reasons why we did not perform many experiments in transverse plane.

2.3. Doppler signal analysis

2.3.1. Experimental determination of the spinal hemodynamic response function

Because of the short duration of noxious electrical stimulations used and the lack of previous descriptions of hemodynamic response in the rat's spinal cord, we first sought to determine the rat spinal HRF in our experimental conditions. This was necessary to correlate the variations of Doppler signal with the stimulation pattern accurately, and to produce activation maps. A strong (supramaximal 5 mA)

stimulation of C fibers was applied for the shortest duration that produced a reproducible response (2 seconds). To stimulate accurately and reproducibly, the stimulations were triggered by the ultrasound scanner using an Arduino board. Five acquisitions per rat in 2 rats were used to determine the HRF as measured by fUS imaging in the spinal cord of the rat experimentally. All acquisitions were averaged, and the analytical equations of the HRF were determined by fitting an inverse gamma distribution, as previously described by other authors⁴⁴ using Matlab (Isqcurvefit, Optimization Toolbox).

2.3.2. Doppler signal analysis and activation maps

Doppler data were analyzed using a generalized linear model approach implemented in Matlab. In the design matrix, the stimulation pattern was convoluted with our fUS-determined HRF for shortest electrical stimulation and we obtained Z-score and P-value map. The activation maps show the Z-score of all the pixels in the image with P-value < 0.05 (before Bonferroni correction).

We chose our region of interest (ROI) by calculating a 7-by-7 pixel-square centered on the maximum of the thresholded Z-score map, and the signal was averaged along the 2 spatial dimensions to obtain a single temporal signal. The spatially averaged signal was then expressed as an SBV increase (in percent) by subtracting the SBV baseline (calculated for each acquisition by averaging all the temporal data within the spinal cord where the stimulation pattern was strictly equal to 0) and by dividing by the SBV baseline. Spinal blood volume increases were calculated by isolating each peak and by averaging the temporal signal between t_1 and t_2 , where t_1 and t_2 were determined using the width at half maximum for the considered peak. The baselines between each stimulation peak couples were estimated separately.

2.3.3. Statistical analysis of the evoked spinal hemodynamic responses

The statistical analysis was performed using a linear mixed model (LMM). Such approach is particularly interesting in the case of nonindependent, hierarchical data, which is the case of the results produced (ΔSBV or Z-scores from individual or series of stimulations, in series of acquisitions, in several animals). In addition, both fixed and random effect factors can be introduced. In our set of experiments, the fixed effect factor was the condition (eg, location of hemodynamic response [dorsal horn, ventral horn]) or the intensity of fiber stimulation, whereas the animals and acquisitions are random effect factors.

Data were first transformed by taking their square root to homogenize the variance across groups, as assessed with Bartlett test. The LMM was fitted with the restricted maximum likelihood method using Matlab's function *fitlme*. Residual normality was tested with Shapiro–Wilk test. In the case of more than 2 conditions, *post hoc* tests of significance of the fixed factor effect between couples of conditions were performed with a likelihood ratio test using Matlab's function *coefTest*, using Bonferroni correction for multiple testing.

Results of the LMM are shown in detail in Supplementary table 1, whereas results of the *post hoc* tests are presented in the Supplementary table 2 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B176>).

- (1) Condition: evaluation of the significance of the changes of SBV due to the condition, such as comparison in the dorsal horn vs ventral horn, inflamed vs naive, etc.
- (2) Animal: evaluation of the significance of the changes due to differences in animals.

- (3) Acquisition: evaluation of the significance of the changes due to differences in acquisitions, ie, 4 trains of stimulations, each one given rise to a value of evoked SBV (indicated as “Total number of stimulations” in the table).
- (4) Homoscedasticity: homogeneity of variance is assumed by the LMM. P values >0.05 suggest that the variance was indeed homogenous after the square root transformation of the data.
- (5) Residual normality: error normality is assumed by the LMM. Therefore, analysis of the residual normality is a good indicator of how well this hypothesis is fulfilled (it is the case with a few exceptions).

2.3.4. Analysis of the somatotopy

Spinal somatotopic activations were performed by electrically stimulating different dermatomes corresponding to lumbar levels L3, L4, and L5 using a standard stimulation protocol as described above (40 Hz, 5 seconds, 3 mA). Activation maps were computed as previously described. Once filtered, the centroid was calculated as the Z-score weighted barycenter. We only kept the horizontal (anteroposterior) coordinates. We measured the L5-L4 and L5-L3 distances; L5 was used as the horizontal axis origin for this somatotopic study. The averaged position of L4 and L3 was calculated by averaging all the corresponding distances. Results were presented as level contour lines, those of the first, second, and third quartiles of the Z-score.

2.4. Ultrasound localization microscopy

For ULM, a catheter filled with saline was inserted in the rat jugular vein before the positioning of the animal and the laminectomy. Ultrasound localization microscopy was performed similarly to the methods described in.^{14,23,29} Briefly, 150 μL of SonoVue microbubbles (reconstituted in 5 mL of saline) were injected through the catheter in the jugular vein, followed by 100 μL of saline. Two hundred blocks of 600 successive compounded frames (with angles at -5° , 0° , $+5^\circ$, at 3000 Hz pulse repetition frequency with a 10-mm imaging depth) were acquired every second using the same probe ($f = 15$ MHz, 128 elements, Vermon). The elevation focusing was achieved by a plastic lens to reach 500 μm at 8-mm elevation focal depth. The acquisitions were performed using the same setup and software as above.

Small rigid motions were corrected through phase-correlation.³⁰ Singular value decomposition filters¹⁷ were used to extract bubble signals from surrounding tissues by removing only the 2 first singular values and by applying a second-order Butterworth high-pass filter with a cutoff frequency of 20 Hz to remove remaining tissue signal. Microbubbles were localized using a weighted average method.²⁸ Microbubbles were detected as the brightest local maxima on the image. Then, the position of the microbubbles within the pixel was determined using a weighted average on the intensity in the neighboring pixels. Microbubble tracks were formed by pairing microbubbles between frames using Matlab’s (“simple-tracker”) tracking algorithm, which is based on the Hungarian method for assignment.³⁶ Distances to all the microbubbles in the following frame were calculated. The Kuhn–Munkres algorithm then minimizes the total distance, thus connecting all the positions of a microbubble to form a collection of its position in the different frames. Velocities were calculated as the mean displacement between 2 consecutive frames. The microbubble track was completed using linear interpolation to fill missing points. The track was then smoothed using a sliding average along 5 positions, and the positions were rounded to the chosen pixel sizes.

3. Results

3.1. Vascular anatomy of the spinal cord

In a preliminary study, we tested the possibility to image the rat spinal cord through both the vertebral muscles and the vertebra. As expected, due to the reflection and attenuation of the wave propagation through the bone, the presence of the vertebra prevented the imaging of spinal blood vessels completely. As a consequence, as previously shown by others in the context of shear wave elastography and functional ultrasound,^{65,84} only small portions of spinal cord were visible through the intervertebral space. To study spinal cord physiology using fUS, we chose to use a large laminectomy at the level of the lumbar enlargement.

Imaging the baseline power Doppler signal (without external stimulation) at the rate of 1 Hz was sufficient to study the anatomical vascularization of the rat lumbar spinal cord.

Imaging first in a transverse view, we observed a strong signal in the posterior spinal vein (PSV), a vein that runs dorsally between both right and left dorsal horns; the anterospinal artery (ASA) that, on the contrary, runs ventrally between both ventral horns with fast blood flow speeds (>15 mm/s); and the dorsal extension of the ASA from the ventral to the dorsal horn (Figs. 1A and B). Surprisingly, no signal could be detected in some parts of the dorsal horn (laminae I-II for instance, Fig. 1B) and in the white matter of the ventral horn (Figs. 1B and D), apart from initial bifurcations of the ASA.

To identify these vascular structures, an in toto vascular staining of the vasculature using intracardiac perfusion of the fluorescent dye Dil was performed in 3 animals, as previously described.⁴² The staining produced (Fig. 1C) confirmed the presence of staining in the PSV and ASA and allowed the visualization of the vasculature in the parenchyma of the dorsal and ventral horns. Measurement in fixed tissues leads to a diameter value of 200 μm for the ASA, 20 μm for the CSA (central sulcal artery) and PSA (posterior spinal artery), and 5 μm for the vasculature in the parenchyma, as in the brain. The small size of the latter is the obvious reason why the vasculature of the parenchyma cannot be imaged in fUS imaging.

To circumvent this problem, we performed ultrafast ULM using intravenous injection of biocompatible microbubbles. This approach relies on the separation and localization of echoes of intravascular microbubbles to reconstruct super-resolved images. It is similar to the localization of blinking fluorescent sources in photoactivated localization microscopy, which improves the optical resolution by more than 10-fold.⁴ We previously showed that this approach allows the imaging of small vessels (approx. 10 μm) in the rat cortex.²³ This in vivo microscopy localization confirmed that the spinal cord is a highly vascularized organ with a dense network of capillaries in both dorsal and ventral horns (Figs. 1D and F). The size of the blood vessels imaged using this approach is consistent with the measurements performed in fixed tissues (Fig. 1G, ie, a diameter inferior to 5 μm in capillaries). Blood flow speeds quantified using microbubble tracking in ULM showed fast flows at 15 to 20 mm/s and higher in the ASA, moderate flows at 5 to 8 mm/s in CSA and PSA arteries, and even lower ones in small-diameter vessels of the dorsal horn (1–5 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ for 10–50 μm arteriole diameter). As expected, the measured blood velocities are much lower in the vein (PSV) and the parenchyma (10 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ and 1–5 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, respectively), as compared to ASA.

Imaging in the sagittal view using both fUS imaging and ULM confirmed over several lumbar levels the previous observation of strong signals in arterial elements but weaker in the dorsal horn. We also observed new sets of “y” structures formed by the CSA in

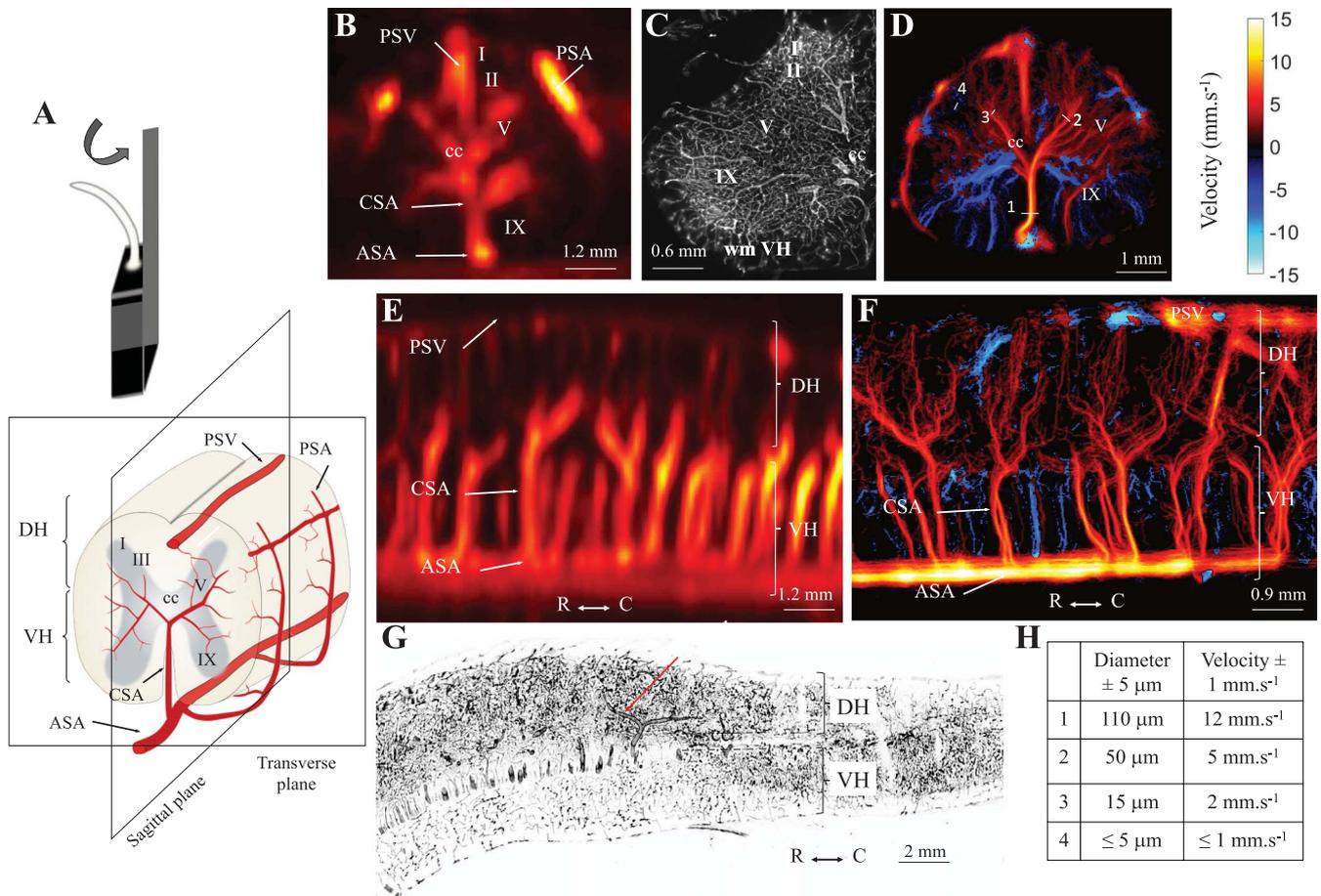


Figure 1. Vascular anatomy of the rat spinal cord. (A) Diagram showing the major veins and arteries in the spinal cord and their position with respect to the sagittal and transverse imaging planes. (B–D) Imaging of the rat spinal blood volume in transverse view, using fUS imaging (B) or using ultrasound localization microscopy imaging (D), showing a strong spinal blood volume in the posterior spinal vein (PSV), a vein that runs dorsally between both right and left dorsal horns; the anterospinal artery (ASA) that, on the contrary, runs ventrally between both ventral horns; and the dorsal extension of the ASA from ventral to the dorsal horn. Although classic fUS imaging does not reveal any Doppler signal in the white matter and the most part of the dorsal horn (laminae I and II), ULM imaging (D) and in toto staining of the vascularization (C) reveals a thin vascular network of capillaries in these areas. (E–F) Functional ultrasound (E) and ULM imaging (F) of the spinal cord in sagittal view, at the level of the midline, showing highly contrasted “Y” structures, that originate from the ASA, whose vertical part is the CSA, while splitting in 2 branches at the level of the central canal, either dorsally in the dorsal horn (positive flux, red arterioles, E), or ventrally in the ventral horn (negative flux, blue arterioles, F). (D and F) Ultrasound localization microscopy imaging and analysis of the directionality of the flow. Ultrasound localization microscopy imaging was achieved with the intravenous injection of biocompatible microbubbles. The super-resolution image was reconstructed from microbubble tracking and false colorized. The colour indicates the directionality of the bubbles (blue: going ventrally, red: going dorsally) and the colour intensity indicates the velocity of the bubbles in these directions. (H) Quantitative measurements of both the diameter of some spinal blood vessels and the velocity of bubbles in these blood vessels. (C and G) *In toto* staining using vascular injection of Dil reveals a dense network of blood vessels in the spinal dorsal horn, and a sparser network in the ventral horn. The central canal (cc) that delineates the dorsal from ventral horns is clearly visible as a lack of staining. The arrow in G points at one of the “Y” structures, which is clearly a vascular structure of large diameter. ASA, anterior spinal artery; CSA, central sulcal artery; DH, dorsal horn; PSV, posterior spinal vein; VH, ventral horn; wm VH, white matter of the ventral horn; ULM, ultrasound localization microscopy.

its anteroposterior projections (Fig. 1F). These structures were observed at the level of the midline (lateral = 0 mm). This was confirmed using longitudinal spinal sections stained in toto using Dil (red arrow, Fig. 1G). An analysis of the microbubble’s direction pointed out an ascending flow from the ASA to the dorsal horn, and a descending flow to the ventral horn (Figs. 1D and F). Finally, the comparison of the Dil staining in the transverse and sagittal views allowed us to observe that the density of blood vessels is much denser in the gray matter than in the white matter (Figs. 1C and G).

3.2. Functional activations in the rat spinal cord in health and disease

The second aim of our study was to determine the physiological properties of the spinal hemodynamic response induced by

noxious and innocuous peripheral stimulations. Indeed, as shown in the past by several authors, such stimulations induce the activation of spinal neurons in different laminae of the dorsal horn, with specific somatotopic distributions. In addition, through mechanisms of neurovascular coupling,^{24,31} this neuronal activation should theoretically lead to a local hemodynamic response.

3.2.1. Mechanical stimulation of the hind paw

To address this question, we first characterized the hemodynamic response in the dorsal horn of the spinal cord induced by natural nociceptive mechanical stimulations. Manual application of nociceptive mechanical stimulations with a calibrated mechanical clamp induced a strong statistically significant local hemodynamic response in the dorsal horn (Figs. 2A–C). Quantification across all animals and acquisitions showed that

this effect is restricted to the dorsal horn (weakly statistically significant in the ventral horn, red square, **Fig. 2C**) and to the lumbar level (not statistically significant more rostrally or caudally, see the green square located 4 mm caudally or rostrally from the activated area on **Figs. 2A–C**).

Natural stimulation of A β fibers using dynamic stimulation of the foot pad with a brush induced also a statistically significant increase of the local SBV in the dorsal horn (**Fig. 2D**), but this effect was of a lesser amplitude. This effect was also restricted to the dorsal horn (not statistically significant in the ventral horn, see the red square on **Fig. 2D**) and to the lumbar level (not statistically significant more caudally, see the green square on **Fig. 2D**).

3.2.2. Electrical stimulation of the hind paw

To study the HRF and the fiber selectivity of the spinal cord stimulation, we chose to apply noxious or innocuous stimulations

using electrical stimulations of either A β , A δ , or C fibers. In this particular case, although the stimulations applied are obviously less natural, they have the great advantage of being triggered, and provide high temporal accuracy in the evoked response.

Because to date the HRF function of the rat spinal cord was never established, we determined it experimentally to further use it for the deconvolution of the stimulus patterns and therefore obtain a more accurate calculation of the hemodynamic response induced by electrical stimulations.

3.2.3. Determination of the hemodynamic response function

To accurately compute the hemodynamic responses to short stimuli induced by electrical stimulations, we determined the hemodynamic impulse response in the rat spinal cord experimentally, to use it as a transfer function.

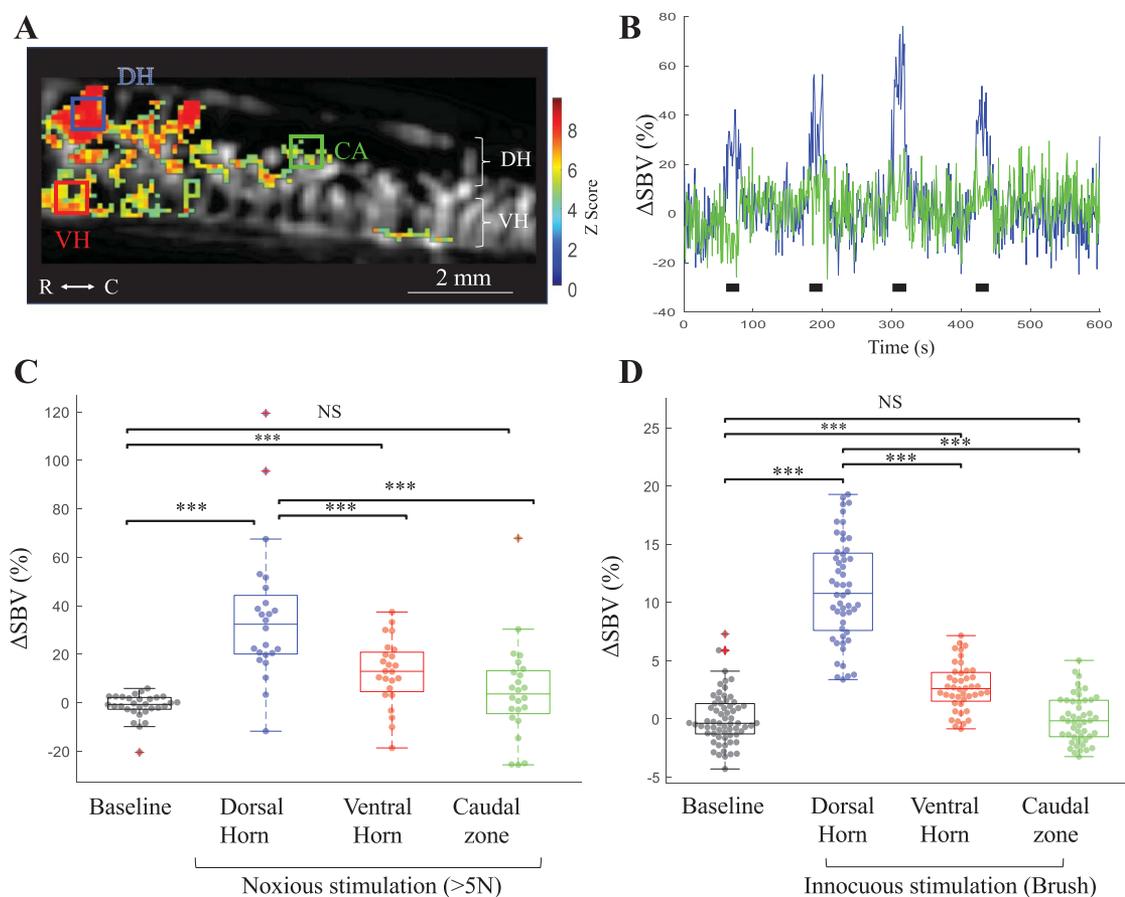


Figure 2. Functional ultrasound imaging reveals that natural mechanical noxious or innocuous stimulations induce a localized hemodynamic response in the spinal dorsal horn in anesthetized rats. (A–C) Hemodynamic response induced by noxious mechanical stimulation, applied using calibrated forceps (<4.5 N). A shows a typical example of the significant spinal hemodynamic response induced by noxious mechanical stimulation, imaged in the sagittal plane using fUS imaging. Are superimposed in (A): the vascularization of the cord imaged in fUS (black and white background) and the z-score of the pixels in the image (red/green pixels) and finally 3 regions of interest: the dorsal horn (DH, blue), ventral horn (VH, red), and the caudal dorsal horn (CA, green). (B) Averaged temporal signals (over all stimulations: N = 52, from 5 animals) over time for the ROIs in the dorsal, showing a strong and robust increased spinal blood volume (SBV) in the lumbar dorsal horn (blue line), but not caudal horn during the stimulation (green line). Black squares indicate the stimulations. The red ROI is not shown for better clarity. The y-axis unit is the relative increase in spinal blood volume compared to baseline (portion of the signal without stimulation). (C and D) Box plots and overlaid individual values of changes in spinal blood volume (SBV) in all individual activations induced by either noxious (C) or innocuous (D) peripheral mechanical stimulations. In both cases, a statistically significant hemodynamic response is observed locally in the dorsal horn (not significant in the ventral horn [red], nor 4 mm more caudally [green]). Note that the amplitude of response evoked by noxious stimulations is much greater than for innocuous stimulations. Colored dots represent individual Δ SBV obtained for all individual stimulations. (C) Baseline: N = 65 from 5 rats—dorsal horn: N = 52 from 5 rats—ventral horn: N = 44 from 5 rats—caudal area: N = 48 from 5 rats. (D) Baseline: N = 30 from 4 rats—dorsal horn: N = 24 from 4 rats—ventral horn: N = 24 from 4 rats—caudal area: N = 24 from 4 rats. Statistical analysis: The statistical analysis was performed using a LMM. In this set of experiments, the fixed effect factor is the condition (eg, location of hemodynamic response [dorsal horn, ventral horn] or the intensity of fiber stimulation), whereas the animal and acquisition are random effect factors. Inclusive results of this analysis are shown in details in Supplementary table 1, and results of the *post hoc* tests are presented in the Supplementary table 2 (available at <http://links.lww.com/PAIN/B176>). They show a lack of effect of the random factors but statistical effect of various conditions. *** $P < 0.001$. NS, nonstatistically significant.

To do so, we applied the shortest supramaximal peripheral stimulation of C fibers that elicited a reproducible response (2 seconds at 5 mA). Five acquisitions per rat on 2 rats were made to determine the HRF for ultrafast ultrasound imaging in the spinal cord of the rat. All acquisitions were averaged (**Figs. 3B and C**), and an inverse gamma distribution was individually fitted to each acquisition. Finally, we averaged the parameters obtained across all the experiments to have the analytical HRF parameters (**Fig. 3C**). We found the following HRF expression (Equation 1):

$$\text{HRF} : t \rightarrow A \cdot \frac{\beta^\alpha}{\Gamma(\alpha)} \cdot t^{-(\alpha+1)} \exp\left(\frac{-\beta}{t}\right), \quad (1)$$

with $A = 6.1 \pm 1.8$, $\alpha = 2.5 \pm 1.3$, and $\beta = 12.7 \pm 7.0$. The onset time (threshold corresponding to an SBV increase reaching twice the amplitude of the SD of the baseline) was of 1.4 ± 0.2 seconds after the stimulation, at $14\% \pm 4\%$ of SBV increase, with a maximal hemodynamic response at 3.0 ± 0.9 seconds after the onset. It is interesting to note that this transfer function is very close to the transfer function between neuronal and vascular responses recently described by Aydin et al² in the olfactory bulb. Also, despite the difference of location in the central nervous system, the physiological properties of this HRF (onset time and time to peak) were very similar with previous observations in the brain of anesthetized rats: (2.0 seconds $\pm 0.3/5 \pm 0.7$,²²) and awake nonhuman primates (1.4 seconds $\pm 0.6/2.5$ ²⁰). These results are also consistent with measurements described in the literature using functional magnetic resonance imaging (fMRI).^{26,64,82} Some authors reported very different time response (10 seconds) in the human spinal cord. The fact that this was for a motor task (and not sensory) might explain the difference. However, as we measured blood volume and not deoxyhemoglobin, neither initial dip nor poststimulus undershoot was present.

3.2.4. Functional activation in the spinal cord using electrical stimulation

To evaluate the ability of the different afferent modalities to induce an evoked hemodynamic response, we stimulated electrically different groups of peripheral afferents, using previously described parameters.^{10,40,64} Note that when the intensity of stimulation is increasing, fibers of lower threshold are also stimulated. Therefore, A β fibers are also stimulated when A δ and/or C fibers are stimulated.

Electrical stimulations of A β fibers (0.5 mA,¹⁰) did not evoke any hemodynamic response ($-0.4 \pm 6.0\%$ SBV) compared to baseline ($0.5 \pm 0.7\%$ SBV, $P > 0.05$). Electrical stimulation of A δ (1.5 mA,^{10,64}) and C fibers (3 mA,^{10,40}) fibers, however, induced a statistically significant hemodynamic activation (**Figs. 4A–C**, $35.4 \pm 5.1\%$ SBV, $P < 0.001/73.4 \pm 7.5\%$ SBV, $P < 0.001$, respectively). The amplitude of the response induced by C fibers was greater than the one induced by A δ fibers, suggesting that C fibers have a major role in this effect.

Finally, spinal topic application of ketamine (an NMDA receptor antagonist) completely blocked the hemodynamic response induced by C-fiber stimulation ($-0.4 \pm 1.5\%$ SBV, $P > 0.05$ compared to baseline). These results suggest that (1) the evoked spinal neurovascular response is fiber-specific and (2) that glutamate (through the involvement of the NMDA receptor) plays a major role in the hemodynamic activation induced by C fibers. As further discussed in the discussion section, this hemodynamic response is likely to be the dual consequence of specific neuronal activation and neurovascular coupling.

3.2.5 Spatial localization of the spinal hemodynamic response

All neurovascular responses observed in the dorsal horn imaged in the sagittal plane were of heterogenous oval shape (**Fig. 4A**), typically (after C-fiber stimulation) 2 mm long.

The reason for this shape and size could be (1) the spinal areas where responsive neurons are located and (2) the spread of increased local blood supply, 2 hypotheses that are not mutually exclusive.

At each spinal level, activated primary sensory afferents enter the dorsal horn of the spinal cord ipsilaterally, terminating in different laminae of the dorsal horn, locally activating various subpopulation of dorsal horn neurons. Therefore, imaging the hemodynamic response induced by C fibers in the transverse plane could provide crucial clue on the specificity of the hemodynamic response measured in fUS towards neuronal activation. As shown in **Figure 4D**, despite the thin network of blood vessels and weak Doppler signal in laminae I-III (**Fig. 1**), a strong increased blood volume was observed in laminae I-V (**Figs. 4D and E**) of the dorsal horn ipsilateral to noxious stimulation ($44.0 \pm 3.1\%$ SBV vs $0.2 \pm 0.7\%$ SBV for baseline, $P < 0.001$). This effect was not observed in the contralateral dorsal horn ($1.4 \pm 1.8\%$ SBV, $P > 0.05$ compared to baseline), suggesting a specific hemodynamic response where activated neurons are known to be located. Therefore, this restricted area of activation of approximately 1 mm suggests that fUS imaging faithfully measures the local increased blood volume induced by neuronal activation.

3.2.6 Spinal hemodynamic response respects the somatotopy of afferent entries in the dorsal horn

Compelling evidence brought forward from different but complementary techniques ranging from electrophysiological recordings^{52,88} to tracing experiments^{73,88} and Evans blue extravasations^{74,75} have shown that entries of afferent fibers are somatotopically organized in the spinal cord, activating nociceptive specific or nonspecific neurons in the corresponding spinal cord levels. However, due to the difficulty to image in the spinal cord, no neuroimaging technique so far was able to verify such mechanisms in vivo. Combining the large field of view achievable in fUS imaging of the spinal cord, the high spatial resolution, and sensitivity of the technique, using electrically stimulated C fibers in different dermatomes consecutively (L3, L4, or L5) in the same animal, we analyzed the spatial shift of the activated areas. As shown in **Figure 5A** (example in one animal), the areas of activation shift along the neuroaxis caudally as the stimulated dermatomes shift from L3, L4, to L5. This phenomenon was quantified over several animals by calculating the weighted centroid of the activated area (white stars in **Fig. 5B**), using the location of L5 in each animal as the spatial reference. Note that surroundings of the activated areas are shown as correlation level curves in **Figures 5B and C**, using the following color code: red (L3), blue (L4), and green (L5). This analysis confirmed that the area functionally activated by C-fiber stimulation shifted caudally of approximately 1.2 ± 0.4 mm between L5 and L4 and 2.5 ± 0.3 mm between L5 and L3.

In a transverse plane of imaging, this analysis showed that the functionally activated areas were restricted to the whole laminae I, II, III, and the medial aspect of laminae IV and V, with a weighted centroid located in the medial part of lamina III (**Fig. 5E**). These are the spinal locations of nociceptive specific and nonspecific neurons.

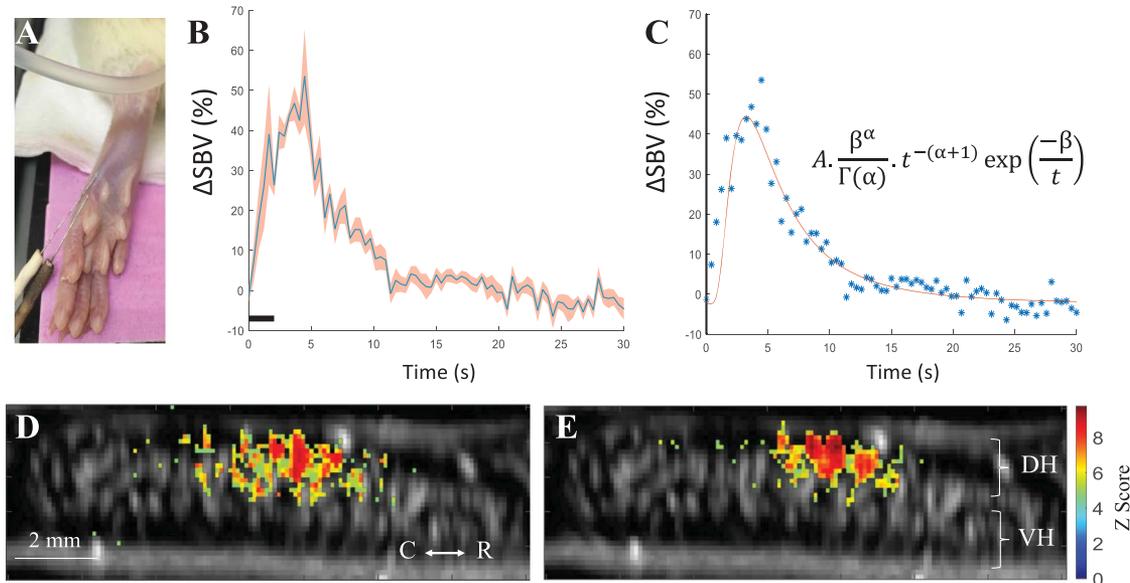


Figure 3. Determination of the spinal hemodynamic response function using functional ultrafast ultrasound imaging. (A) Image illustrating the implantation of the stimulation acupuncture electrodes in the rat hind paws. (B) Average changes (blue line) \pm standard error deviation of the mean of the spinal blood volume evoked by peripheral noxious electrical stimulations in all animals and stimulations (2 rats, 5 acquisitions per rat, $N = 20$ individual stimulations). Black line illustrates the stimulation (2 seconds, 40 Hz, 5 mA). (C) Analytical determination of the fUS HRF using inverse gamma distribution. These acquisitions were fitted individually, and the final values are the mean of each fit. The figure shows the individual values (blue dots) and the fitted function (red line). The equation and parameters are indicated in the panel ($A = 6.1 \pm 1.8$, $\alpha = 2.5 \pm 1.3$, $\beta = 12.7 \pm 7.0$). (D–E) Example of activation maps in one representative animal, showing the Z-score of all the pixels in the image with a P -value $< (0.05/\text{image size in pixel})$ (Bonferroni correction). (E) Without the use of the HRF in the correlation model, whereas (D) is with the use of our hemodynamic response function convoluted with the stimulation pattern. Orientation: caudal (C)—rostral (R) is indicated. fUS, functional ultrasound; HRF, hemodynamic response function.

3.2.7. Imaging of A β fibers induced mechanical allodynia

Allodynia is an abnormal pain perception induced by the application of an innocuous stimulation. It is probably the most frequent and debilitating clinical symptom observed in chronic pain diseases (both in clinical condition and in animal models³³). Because pathways mediating pain and touch are segregated in physiological conditions, there is a large consensus that allodynia might be due to the functional reorganization of spinal circuits.^{37,38}

During the installation of peripheral inflammation, due to the tonic activation of sensitized primary afferent fibers, the spinal mechanism of central sensitization takes place, in which spinal neurons are in a state of facilitation, potentiation, augmentation, or amplification.³⁸ In this inflammatory condition, wide-dynamic-range neurons have an increased spontaneous firing rate, and the application of a low-threshold mechanical stimulation induces both a pain sensation (allodynia) and an increased firing rate of these neurons, but not of nociceptive-specific neurons.⁵⁰

In this study, we reevaluated the neurobiological mechanisms underlying allodynia in inflammatory pain, imaging the neurovascular response to mechanical tactile allodynia in a model of central sensitization induced by short-term inflammatory pain (24 hours after unilateral subcutaneous injection of Complete Freund's Adjuvant [25 μ L, Sigma Aldrich, France] in the hind paw). Using the large field of view and the temporal resolution of fUS imaging, we imaged the hemodynamic response evoked by stimulation of low-threshold mechanoreceptors (induced by brush stimulation on the hind paw) and observed an increased spinal hemodynamic response in inflamed animals compared to the controls (Fig. 6). This increased responsiveness was characterized by an increased evoked local SBV in the dorsal horn (Fig. 6D).

4. Discussion

Functional ultrasound imaging is a relatively new modality of neuroimaging that allows, through ultrafast imaging of blood flow,

the study of functional activations^{5,25,55} and functional connectivity.^{55,58} Compared to other modalities of neuroimaging, it has a very good spatial resolution, competing with the best fMRI scanners.^{12,71,81} The temporal resolution is remarkably high. However, because the physiological process measured by fUS imaging is happening at slower temporal and larger spatial scales than the actual imaging modality due to the neurovascular coupling, both the effective spatial and temporal resolutions are thereby limited. It has to be noted, nevertheless, that this fast temporal resolution enabled us in the past to measure directional propagation of hemodynamic signals within layers of the cortex in the primate brain, thanks to lag correlation at high sampling rates (<10 ms) faster than the cardiac cycle or the hemodynamic response.²⁰ The effective spatial resolution provided in fUS imaging was also shown to be comparable to the resolution of the CBV images in another recent work.⁵ During auditory stimuli, Bimbard et al.⁵ demonstrated in awake ferrets that fUS imaging was able to provide voxel-to-voxel independent information both in the auditory cortex and deep-seated regions with an effective resolution of 100 μ m for voxel responsiveness and 300 μ m for voxel frequency tuning. Probably the 2 main advantages of fUS imaging are its high sensitivity (comparable to calcium imaging at the pixel level, as demonstrated recently⁶) and its portability compared to other techniques. Apart for very recent developments in 3D imaging,⁵⁷ the main disadvantage of the technique (compared to others) is the imaging in 2 dimensions. Also, as ultrasounds are attenuated by bones, apart in conditions where the skull is thin (rat pups, mice⁷⁹) or naturally (through the fontanel in infants¹⁶) or surgically opened (perioperative interventions in adults³²), fUS imaging requires more invasive preparations (such as a laminectomy in this study).

4.1. Functional activations in the rat's spinal cord

It has long been established that peripheral application of a noxious stimulus induces in the spinal cord a concomitant increased

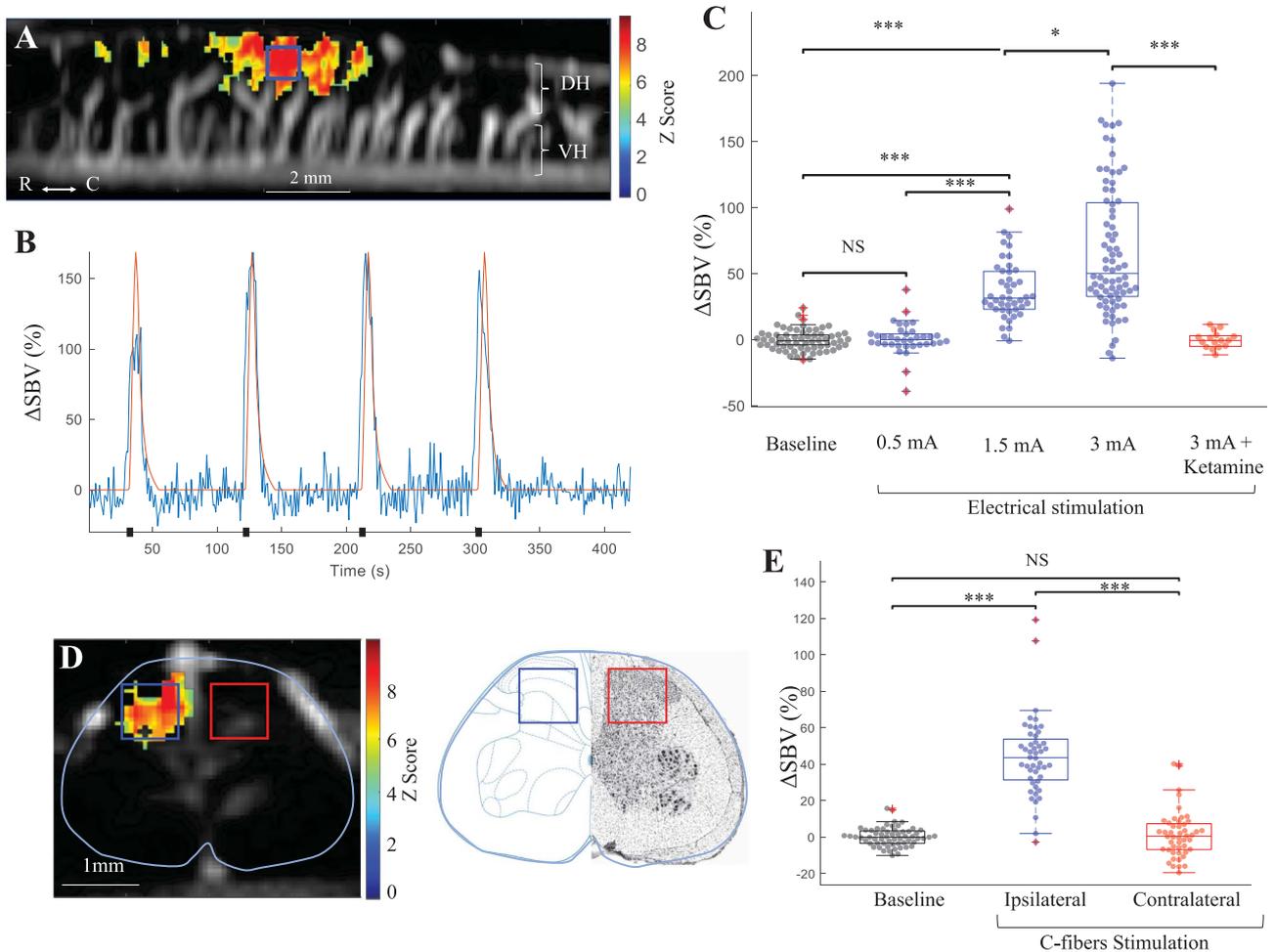


Figure 4. The spinal hemodynamic response induced by peripheral electrical stimulation is fiber-specific and localized ipsilaterally. (A) Typical example of functional activation induced in the dorsal horn in a naive rat by the electrical stimulation of C fibers (imaged in sagittal view). The functional activation was calculated using a global linear model, using the analytical HRF obtained previously. The color bar indicates the Z-score. (B) Averaged temporal dynamic of Doppler signal in relative augmentation of the spinal blood volume induced by electrical stimulation of C fibers in all stimulations (3 mA, N = 84, from 9 rats). Black dots represent electrical stimulations (5 seconds). The blue line represents the average experimental Doppler signal over all stimulations (N = 84), whereas the orange line represents the theoretical response to the stimulation pattern describing the spinal cord HRF. (C) Statistical analysis of hemodynamic responses induced by either 0.5 mA (A δ fibers), 1.5 mA (A δ fibers), or 3 mA (C fibers) stimulation showing that only A δ - and C-fiber stimulations induced a significant hemodynamic response. The C-fiber response was specifically blocked by NMDA-receptor antagonist, ketamine, suggesting that glutamatergic neurotransmission through the NMDA receptors is a necessary mechanism in this neurovascular response. (D–E) Functional ultrasound imaging of the hemodynamic response induced by C-fiber stimulations viewed in a transverse plane. (D) Example of a functional activation map in one rat showing that the area activated is in the ipsilateral dorsal horn. The scale applies to both panels of (D). (E) Statistical analysis of these functional activations over all individual stimulations (N = 48, from 5 animals), showing that the response is statistically significant only in the ipsilateral dorsal horn, suggesting a very localized and specific neurovascular response to the C-fiber stimulations. Results were expressed as in (C). In (C and E), colored dots represent individual Δ SBV obtained for all individual stimulations (C: Baseline: N = 105 from 9 rats—3 mA: N = 84 from 9 rats—1.5 mA: N = 48 from 5 rats—0.5 mA: N = 36 from 9 rats—3 mA + ketamine: N = 16 from 4 rats). (E) Baseline: N = 60 from 5 rats—ipsilateral and contralateral: N = 48 from 5 rats). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Orientation: caudal (C)—rostral (R), dorsal horn (DH), and ventral horn (VH) are indicated. HRF, hemodynamic response function; NS, nonstatistically significant.

neuronal activity,¹¹ energy consumption,³⁴ metabolic response,⁴⁹ and BOLD signal.³⁹ Interestingly, the physiological properties of the neurovascular coupling in the brain and the spinal cord are very similar.^{13,54} One important difference, however, is the tight neurovascular coupling that exists in the spinal cord between neuronal activation and increased blood flow, independently of changes in mean arterial blood pressure, a feature not observed in the brain after C-fiber stimulations.⁵⁶

Our study showed, using fUS imaging, a C-fiber-evoked hemodynamic response (elicited by activation of either natural noxious mechanical stimulations or electrically activated C fibers) in the ipsilateral dorsal horn to the stimulus and was restricted spatially to approximately 1 to 2 mm, after the somatotopy of the dermatome stimulated. The localization in the ipsilateral dorsal horn is consistent

with previous observations by other groups using fMRI,^{43,46,48,90} intrinsic optical imaging,⁶¹ and in light scattering imaging,²⁷ and suggests, as discussed by these authors, that the spinal neurovascular response observed is extremely locally restricted to ipsilateral site and to laminae in the dorsal horn where activated neurons are located. A large number of studies in human subjects also reported a contralateral activation after noxious heat stimulations^{9,59,69,86} (and sometimes innocuous ones⁵⁹). But this feature was not always observed in human subjects^{7,21,53} and usually not observed in anesthetized rodents. The nature and intensity of the stimulations, as well as the presence of anesthesia, might explain the difference of results. The observations both in human⁷² and macaque,⁶⁹ in the same subjects of a unique ipsilateral activation

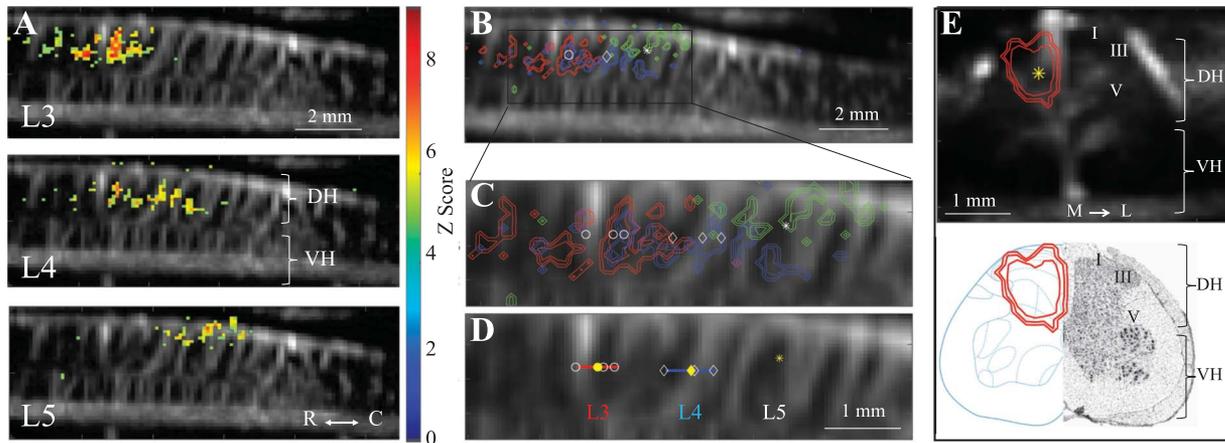


Figure 5. The spinal hemodynamic response respects the somatotopy of afferent entries in the dorsal horn. (A) Typical example in one animal of spatial shift the spinal area functionally activated (z-score map) by C-fiber stimulation in the dermatomes L3, L4, and L5. The scale bar (2 mm) applies to all panels in (A). (B–E) Quantification of the spatial areas functionally activated over several animals (and their spatial shift) by calculation of the weighted centroid of these areas, in the sagittal plane (B–D) and in the transverse plane (E). (B and E) The white stars are the weighted centroid of the correlations averaged over all the acquisitions (N = 6 individual acquisitions in B–D; N = 6 in E). (B–D) Color code of the different dermatomes: red: L3, blue: L4, and green: L5. The blue, red, and green curves represent contour lines corresponding to the first, second, and third quartiles of the correlations, respectively. (C–D) The centroid of L5 (star) was used as an invariant point to allow relative calculation for L4 (diamonds) and L3 (circle) positions on different animals. Only the horizontal position was taken into account; the vertical position was ignored. (N = 4 rats; 4 for L5, 3 for L4, and 3 for L3). (D) The yellow star represents the centroid of the calculated relative positions for the dermatome L4 (diamonds, blue) and L3 (circle, red). The scale bar in (D) applies for (C and D). (E) Same as (B) in a transverse plane at lumbar level L4 (obtained from one animal and 6 activation maps). The bottom panel in E allows the localization of the laminae where the response is observed. Orientation: caudal (C)—rostral (R), dorsal horn (DH), ventral horn (VH), medial (M), and lateral (L).

induced by innocuous stimulation but both ipsilateral and contralateral activations by noxious heat, support this hypothesis.

Stimulation of the interdigit territories are known to activate diverse dermatomes, inducing the transmission of sensory signal in the tibial and (to a smaller extent) to the saphenous nerves to the spinal segments L3 to L5 where they activate postsynaptic neurons.^{74,75} Study of the somatotopy of hemodynamic responses in the spinal cord using neuroimaging was performed previously in human subjects^{7,9,53,68,70} but, to the best of our knowledge, it had never been performed in rodents. Despite the spatial heterogeneity of the activated area, we identified the centroid of this activation area and demonstrated its spatial shift along the lumbar segment when stimulations were successively applied to the L3, L4, or L5 dermatomes. The spatial translation of these activation areas along the lumbar segment (L3–L5: 2.5 ± 0.3 mm, L4–L5: 1.2 ± 0.4 mm) was found to be consistent with the known neuroanatomy of the rat spinal cord⁶⁵ and location of the activated areas in these specific segments.^{73,74,88}

It is interesting to note that although the vasculature of the parenchyma could not be detected in fUS imaging (Fig. 1, and was only detected using ULM), functional activations (ie, measurements of Doppler signal in correlation with the stimulus) could be easily detected using fUS imaging, suggesting the high sensitivity of the technique to detect subtle changes of task-evoked SBV. This agrees with previous observations that fUS imaging is sensitive enough to measure neurovascular changes at the pixel level, within single trials.⁶

Surprisingly, the shape of the spinal area activated, observed in the sagittal axis, was spatially heterogeneous. Independently of the stimulus intensity, it was consistently formed by 2 to 3 discontinued ovals of 700- μ m diameter in the anteroposterior axis. It can be hypothesized that this heterogeneous form could be due to (1) the possible heterogeneity in either the afferent fibers and/or the spatial distribution of spinal neurons and/or (2) a heterogeneity in the diameter of the blood vessels irrigating the spinal segment. It has long been described that the somatotopic distribution of tibial, sural,

and saphenous nerves terminates in a widespread manner in laminae I–V of the lumbar segments L3 to L5.^{62,73} Concomitantly, postsynaptic neurons are located homogeneously either in superficial laminae (laminae I, where nociceptive specific neurons are located) or in deep laminae (where nonspecific nociceptive neurons are located).^{8,87,88} Therefore, because both afferent and postsynaptic neurons are quite homogeneously distributed throughout each spinal segment, it is likely that the heterogeneous shape of the activated areas has a vascular origin.

4.2. Intensity-specific hemodynamic response

The comparison of the efficacy of the various types of afferent fiber stimulation to induce an evoked spinal hemodynamic response showed that C fibers and A δ stimulation induce a robust hemodynamic response due to local neuronal activation through an NMDA receptor-dependent mechanism. Zhao et al.⁹¹ showed previously that imaging of the spinal cord allows pharmacological studies in the rat. Stimulation of large myelinated fibers through innocuous stimulations gave rise to increased SBV, but to a smaller extent than other types of fibers. Such increased neurovascular coupling induced by innocuous stimulation has been detected in fMRI in humans,^{7,53,59,67,68,70} but not in animal models, even using intravenous injection of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a gradient echo.⁹⁰ Only one study managed to detect it using light scattering,²⁷ but this approach lacks spatial discrimination.

4.3. Imaging spinal cord's central sensitization

Persistent pain associated with injury or diseases can result from both peripheral and central sensitization. Central sensitization is characterized by a state of hyperexcitability of the central nervous system, in which application of nonnociceptive stimuli (such as the gentle brush of the skin) is perceived as noxious, a clinical symptom termed “allodynia.”³³ Among the approaches usually used to study these

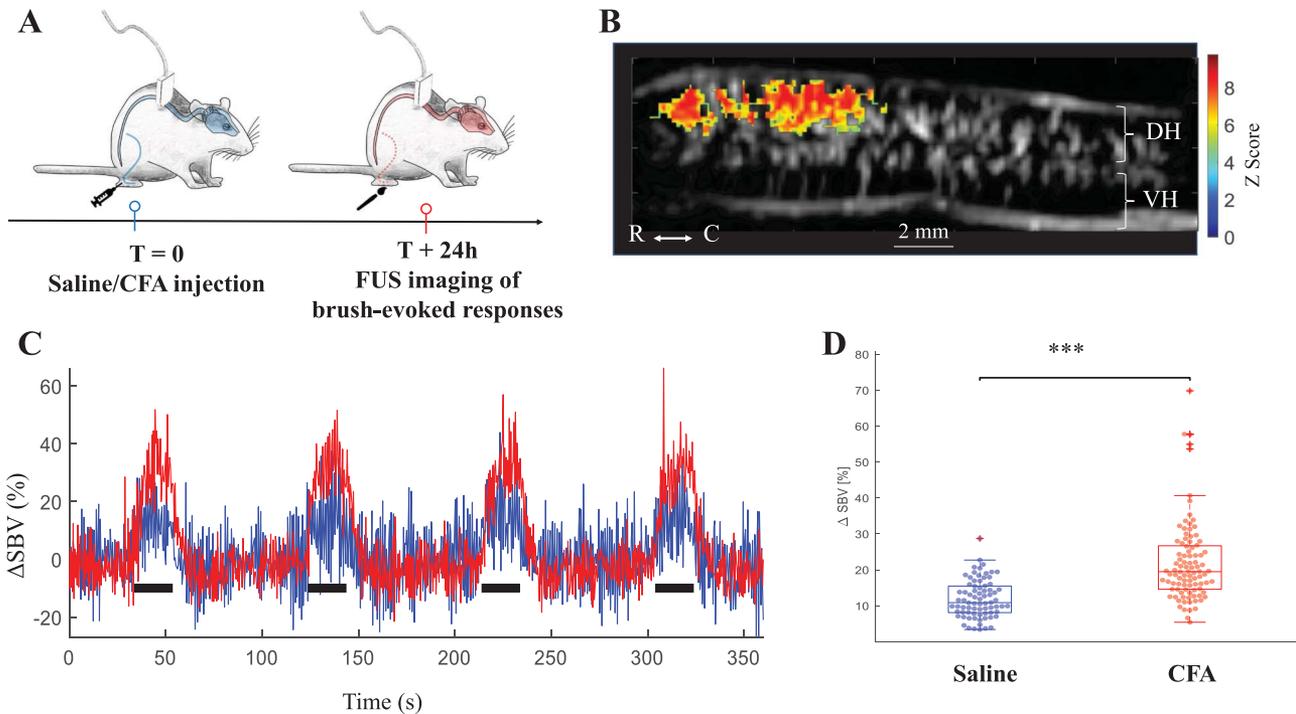


Figure 6. After short-term peripheral inflammation, a peripheral mechanical stimulation (brush, ie, allodynic stimulation) induces an enhanced spinal hemodynamic response. (A) Drawing illustrating the experimental design. At T = 0, animals received a unilateral intraplantar injection of either saline (control group) or inflamed group (Complete Freund’s Adjuvant, CFA). The functional spinal response to a brush stimulation was studied 24 hours later. (B) Typical example of a functional activation in the dorsal horn during mechanical stimulation of the hind paw in one inflamed animal, using a brush. Quantification and presentation of the functional activation was determined as described above. (C) Changes in averaged Doppler signal over time (induced by brush stimulation) in control (blue, 7 rats, N = 76 individual hemodynamic responses) and CFA inflamed rats (red, 7 rats, N = 96 individual hemodynamic responses) in the ipsilateral dorsal horn. The black squares indicate the stimulations of the injected hind paw. The traces were averaged values over all responses in each group. (D) The statistical analysis of these functional activations reveals an enhanced responsiveness in the dorsal horn of inflamed animals (D). Colored dots represent individual Δ SBV values obtained for all individual stimulations (N = 76 in control animals; N = 96 in CFA animals). Statistical analysis (mixed linear model) shows a statistically significant effect of the treatment (Saline/CFA), but also of the animal, suggesting that this effect was not observed in all animals (see Supplementary Table 1, available at <http://links.lww.com/PAIN/B176>). *** $P < 0.001$. Orientation: caudal (C)—rostral (R), dorsal horn (DH), and ventral horn (VH) are indicated. SBV, spinal blood volume.

mechanisms, electrophysiological recordings measure the neuronal activity with excellent temporal resolution, but in an extremely small area. Other approaches (immunohistochemistry) do not allow dynamic reading over time. Imaging of central sensitization using fMRI has previously reported an increased spinal responsiveness in healthy volunteers⁸⁶ and diabetic rats.⁴⁷ Our study measured the spinal responsiveness to allodynic stimulations in the contact of inflammatory pain. Consistent with observations of Rempel et al.,⁵⁹ we observed an exacerbated response in the ipsilateral dorsal horn. These results, that suggest an increased neuronal activity in this model, are consistent with previous demonstrations that in inflammatory conditions, wide-dynamic-range neurons have both an enhanced spontaneous activity and exacerbated response to innocuous mechanical stimulations.⁵⁰

As evidenced in other parts of the CNS, it is very likely that the neuronal hyperexcitability, through a glutamate-mediated signaling mechanisms (such as nitric oxide [from neurons] and arachidonic acid derivatives [from astrocytes]), leads to this enhanced hemodynamic response.^{1,41}

In conclusion, this study revealed the ability of fUS imaging to provide insightful information on the spinal physiology and its potential in the future for the development of analgesic drugs.

Conflict of interest statement

M.T. and T.D. are co-founders and shareholders of Iconeus company and are co-inventors of several patents in the field of

neurofunctional ultrasound licenced to Iconeus company. The remaining authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

The authors thank the CNRS, INSERM, and ESPCI Paris for their financial support, and Iconeus company for their collaboration and support on the software development.

Supported by the Fondation Bettencourt-Schueller, the LABEX WIFI (Laboratory of Excellence within the French Program “Investments for the Future”) under reference ANR-10-IDEX-0001-02 PSL, the National Agency for Research under the program “future investments” with the reference ANR-10-EQPX-15, and the European Research Council (ERC) Advanced Grant FUSIMAGINE. Line Rahal was supported by a fellowship from the “Fondation NRJ”-Institut de France award granted to Mickael Tanter. Finally, this work was supported by the Inserm ART (Technology Research Accelerator) in “Biomedical Ultrasound.” The authors thank Miss Alice Fermigier for her early involvement in the project, Mr Alexandre Dizeux for his help in graphics design, and for his drawing of the cover, Mr J r my Ferrier for the critical reading of the manuscript, and Mrs No mie Dherbe and Nathalie laly-Radio for animal husbandry.

Appendix A. Supplemental digital content

Supplemental digital content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PAIN/B176>.

Supplemental video content

A video abstract associated with this article can be found at <http://links.lww.com/PAIN/B177>.

Article history:

Received 16 March 2020

Received in revised form 28 July 2020

Accepted 20 August 2020

Available online 16 September 2020

References

- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 2010;468:232–43.
- Aydin A-K, Haselden WD, Goulam Houssen Y, Pouzat C, Rungta RL, Demené C, Tanter M, Drew PJ, Charpak S, Boido D. Transfer functions linking neural calcium to single voxel functional ultrasound signal. *Nat Commun* 2020;11:2954.
- Bergel A, Defieux T, Demené C, Tanter M, Cohen I. Local hippocampal fast gamma rhythms precede brain-wide hyperemic patterns during spontaneous rodent REM sleep. *Nat Commun* 2018;9:5364.
- Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 2006;313:1642–5.
- Bimbard C, Demene C, Girard C, Radtke-Schuller S, Shamma S, Tanter M, Boubenec Y. Multi-scale mapping along the auditory hierarchy using high-resolution functional UltraSound in the awake ferret. *eLife* 2018;7:e35028.
- Boido D, Rungta RL, Osmanski BF, Roche M, Tsurugizawa T, Le Bihan D, Ciobanu L, Charpak S. Mesoscopic and microscopic imaging of sensory responses in the same animal. *Nat Commun* 2019;10:1110.
- Brooks JCW, Kong Y, Lee MC, Warnaby CE, Wanigasekera V, Jenkinson M, Tracey I. Stimulus site and modality dependence of functional activity within the human spinal cord. *J Neurosci* 2012;32:6231–9.
- Bullitt E. Somatotopy of spinal nociceptive processing. *J Comp Neurol* 1991;312:279–90.
- Cahill CM, Stroman PW. Mapping of neural activity produced by thermal pain in the healthy human spinal cord and brain stem: a functional magnetic resonance imaging study. *Magn Reson Imaging* 2011;29:342–52.
- Chang C, Shyu BC. A fMRI study of brain activations during non-noxious and noxious electrical stimulation of the sciatic nerve of rats. *Brain Res* 2001;897:71–81.
- Coghil RC, Price DD, Hayes RL, Mayer DJ. Spatial distribution of nociceptive processing in the rat spinal cord. *J Neurophysiol* 1991;65:133–40.
- Cohen-Adad J. Functional magnetic resonance imaging of the spinal cord: current status and future developments. *Semin Ultrasound CT MRI* 2017;38:176–86.
- Cohen-Adad J, Gauthier CJ, Brooks JCW, Slessarev M, Han J, Fisher JA, Rossignol S, Hoge RD. BOLD signal responses to controlled hypercapnia in human spinal cord. *NeuroImage* 2010;50:1074–84.
- Couture O, Hingot V, Heiles B, Muleki-Seya P, Tanter M. Ultrasound localization microscopy and super-resolution: a state of the art. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2018;65:1304–20.
- Davies SN, Lodge D. Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in wind-up of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. *Brain Res* 1987;424:402–6.
- Demene C, Baranger J, Bernal M, Delanoe C, Auvin S, Biran V, Alison A, Mairesse J, Harribaud E, Pernot M, Tanter M, Baud O. Functional ultrasound imaging of brain activity in human newborns. *Sci Translational Med* 2017;9:eaah6756.
- Demené C, Defieux T, Pernot M, Osmanski B-F, Biran V, Gennisson JL, Sieu LA, Bergel A, Franqui S, Correas JM, Cohen I, Baud O, Tanter M. Spatiotemporal clutter filtering of ultrafast ultrasound data highly increases Doppler and fUltrasound sensitivity. *IEEE Trans Med Imaging* 2015;34:2271–85.
- Demene C, Tiran E, Sieu LA, Bergel A, Gennisson JL, Pernot M, Defieux T, Cohen I, Tanter M. 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. *NeuroImage* 2015;127:472–83.
- Dickenson AH, Sullivan AF. Differential effects of excitatory amino acid antagonists on dorsal horn nociceptive neurones in the rat. *Brain Res* 1990;506:31–9.
- Dizeux A, Gesnik M, Ahnine H, Blaize K, Arcizet F, Picaud S, Sahel J-A, Defieux T, Pouget P, Tanter M. Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates. *Nat Commun* 2019;10:1400.
- Eippert F, Finsterbusch J, Bingel U, Büchel C. Direct evidence for spinal cord involvement in placebo analgesia. *Science* 2009;326:404.
- Errico C, Osmanski BF, Pezet S, Couture O, Lenkei Z, Tanter M. Transcranial functional ultrasound imaging of the brain using microbubble-enhanced ultrasensitive Doppler. *NeuroImage* 2016;124:752–61.
- Errico C, Pierre J, Pezet S, Desailly Y, Lenkei Z, Couture O, Tanter M. Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature* 2015;527:499–502.
- Frostig RD, Lieke EE, Ts'o DY, Grinvald A. Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6082–6.
- Gesnik M, Blaize K, Defieux T, Gennisson JL, Sahel JA, Fink M, Picaud S, Tanter M. 3D functional ultrasound imaging of the cerebral visual system in rodents. *NeuroImage* 2017;149:267–74.
- Giulietti G, Giove F, Garreffa G, Colonnese C, Mangia S, Maraviglia B. Characterization of the functional response in the human spinal cord: impulse-response function and linearity. *NeuroImage* 2008;42:626–34.
- He JW, Liu H, Peng Y. Hemodynamic and light-scattering changes of rat spinal cord and primary somatosensory cortex in response to innocuous and noxious stimuli. *Brain Sci* 2015;5:400–18.
- Henriques R, Lelek M, Fornasiero EF, Valtorta F, Zimmer C, Mhlanga MM. QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ. *Nat Methods* 2010;7:339–40.
- Hingot V, Errico C, Heiles B, Rahal L, Tanter M, Couture O. Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in Ultrasound Localization Microscopy. *Scientific Rep* 2019;9:2456.
- Hingot V, Errico C, Tanter M, Couture O. Subwavelength motion-correction for ultrafast ultrasound localization microscopy. *Ultrasonics* 2017;77:17–21.
- Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron* 2017;96:17–42.
- Imbault M, Chauvet D, Gennisson JL, Capelle L, Tanter M. Intraoperative functional ultrasound imaging of human brain activity. *Sci Rep* 2017;7:7304.
- Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol* 2014;13:924–35.
- Kadekaro M, Crane AM, Sokoloff L. Differential effects of electrical stimulation of sciatic nerve on metabolic activity in spinal cord and dorsal root ganglion in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:6010–13.
- Khaing ZZ, Cates LN, DeWees DM, Hannah A, Mourad P, Bruce M, Hofstetter CP. Contrast-enhanced ultrasound to visualize hemodynamic changes after rodent spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 2018;29:306–13.
- Kuhn HW. The Hungarian method for the assignment problem. In: Jünger M, Liebling TM, Naddef D, Nemhauser GL, Pulleyblank WR, Reinelt G, Rinaldi G, Wolsey LA, editors. *50 Years of Integer Programming 1958–2008: From the Early Years to the State-of-the-Art*. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 29–47. doi:10.1007/978-3-540-68279-0_2.
- Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med* 2010;16:1258–66.
- Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 2009;10:895–926.
- Lawrence J, Stroman PW, Bascaramurty S, Jordan LM, Malisza KL. Correlation of functional activation in the rat spinal cord with neuronal activation detected by immunohistochemistry. *NeuroImage* 2004;22:1802–7.
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *PAIN* 1979;6:283–304.
- Lecrux C, Hamel E. Neuronal networks and mediators of cortical neurovascular coupling responses in normal and altered brain states. *Phil Trans R Soc B* 2016;371:20150350.
- Li Y, Song Y, Zhao L, Gaidosh G, Laties AM, Wen R. Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye Dil. *Nat Protoc* 2008;3:1703–8.
- Lilja J, Endo T, Hofstetter C, Westman E, Young J, Olson L, Spenger C. Blood oxygenation level-dependent visualization of synaptic relay stations of sensory pathways along the neuroaxis in response to graded sensory stimulation of a limb. *J Neurosci* 2006;26:6330–6.
- Lindquist MA, Meng Loh J, Atlas LY, Wager TD. Modeling the hemodynamic response function in fMRI: efficiency, bias and mis-modeling. *NeuroImage* 2009;45:S187–98.

- [45] Mace EE, Montaldo G, Cohen I, Baulac M, Fink M, Tanter M. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat Methods* 2011;8:662–4.
- [46] Majcher K, Tomanek B, Jasinski A, Foniok T, Stroman PW, Tuor UI, Kirk D, Hess G. Simultaneous functional magnetic resonance imaging in the rat spinal cord and brain. *Exp Neurol* 2006;197:458–64.
- [47] Maliszka KL, Jones C, Gruwel MLH, Foreman D, Fernyhough P, Calcutt NA. Functional magnetic resonance imaging of the spinal cord during sensory stimulation in diabetic rats. *J Magn Reson Imaging* 2009;30:271–6.
- [48] Maliszka KL, Stroman PW, Turner A, Gregorash L, Foniok T, Wright A. Functional MRI of the rat lumbar spinal cord involving painful stimulation and the effect of peripheral joint mobilization. *J Magn Reson Imaging* 2003;18:152–9.
- [49] Marcus ML, Heistad DD, Ehrhardt JC, Abboud FM. Regulation of total and regional spinal cord blood flow. *Circ Res* 1977;41:128–34.
- [50] McGaraughty S, Chu KL, Xu J. Characterization and pharmacological modulation of nociceptive deep dorsal horn neurons across diverse rat models of pathological pain. *J Neurophysiol* 2018;120:1893–905.
- [51] McMahon SB, Lewin GR, Wall PD. Central hyperexcitability triggered by noxious inputs. *Curr Opin Neurobiol* 1993;3:602–10.
- [52] Menétreay D, Giesler GJ, Besson JM. An analysis of response properties of spinal cord dorsal horn neurones to nonnoxious and noxious stimuli in the spinal rat. *Exp Brain Res* 1977;27:15–33.
- [53] Nash P, Wiley K, Brown J, Shinaman R, Ludlow D, Sawyer A-M, Glover G, Mackey S. Functional magnetic resonance imaging identifies somatotopic organization of nociception in the human spinal cord. *PAIN* 2013;154:776–81.
- [54] Nix W, Capra NF, Erdmann W, Halsey JH. Comparison of vascular reactivity in spinal cord and brain. *Stroke* 1976;7:560–3.
- [55] Osmanski BF, Martin C, Montaldo G, Lanièce P, Pain F, Tanter M, Gurden H. Functional ultrasound imaging reveals different odor-evoked patterns of vascular activity in the main olfactory bulb and the anterior piriform cortex. *NeuroImage* 2014;95:176–84.
- [56] Piché M, Paquette T, Leblond H. Tight neurovascular coupling in the spinal cord during nociceptive stimulation in intact and spinal rats. *Neuroscience* 2017;355:1–8.
- [57] Rabut C, Correia M, Finel V, Pezet S, Pernot M, Deffieux T, Tanter M. 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents. *Nat Methods* 2019;16:994–7.
- [58] Rahal L, Thibaut M, Rivals I, Claron J, Lenkei Z, Sitt JD, Tanter M, Pezet S. Ultrafast ultrasound imaging pattern analysis reveals distinctive dynamic brain states and potent sub-network alterations in arthritic animals. *Scientific Rep* 2020;10:1–17.
- [59] Rempe T, Wolff S, Riedel C, Baron R, Stroman PW, Jansen O, Gierthmühlen J. Spinal and supraspinal processing of thermal stimuli: an fMRI study: processing of Thermal Stimuli. *J Magn Reson Imaging* 2015;41:1046–55.
- [60] Rosa PN, Figueiredo P, Silvestre CJ. On the distinguishability of HRF models in fMRI. *Front Comput Neurosci* 2015;9:54.
- [61] Sasaki S, Yazawa I, Miyakawa N, Mochida H, Shinomiya K, Kamino K, Momose-Sato Y, Sato K. Optical imaging of intrinsic signals induced by peripheral nerve stimulation in the in vivo rat spinal cord. *NeuroImage* 2002;17:1240–55.
- [62] Shortland P, Woolf CJ, Fitzgerald M. Morphology and somatotopic organization of the central terminals of hindlimb hair follicle afferents in the rat lumbar spinal cord. 1989;289:416–33.
- [63] Sieu LA, Bergel A, Tiran E, Deffieux T, Pernot M, Gennisson JL, Tanter M, Cohen I. EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats. *Nat Methods* 2015;12:831–4.
- [64] Silva AC, Lee SP, Iadecola C, Kim SG. Early temporal characteristics of cerebral blood flow and deoxyhemoglobin changes during somatosensory stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:201–6.
- [65] Song P, Cuellar CA, Tang S, Islam R, Wen H, Huang C, Manduca A, Trzasko JD, Knudsen BE, Lee KH, Chen S, Lavrov IA. Functional ultrasound imaging of spinal cord hemodynamic responses to epidural electrical stimulation: a feasibility study. *Front Neurol* 2019;10:279.
- [66] Soubeyrand M, Badner A, Vawda R, Chung YS, Fehlings MG. Very high resolution ultrasound imaging for real-time quantitative visualization of vascular disruption after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2014;31:1767–75.
- [67] Sprenger C, Finsterbusch J, Buchel C. Spinal cord-midbrain functional connectivity is related to perceived pain intensity: a combined spino-cortical fMRI study. *J Neurosci* 2015;35:4248–57.
- [68] Stroman P. Mapping of neuronal function in the healthy and injured human spinal cord with spinal fMRI. *NeuroImage* 2002;17:1854–60.
- [69] Stroman PW. Spinal fMRI investigation of human spinal cord function over a range of innocuous thermal sensory stimuli and study-related emotional influences. *Magn Reson Imaging* 2009;27:1333–46.
- [70] Stroman PW, Bosma RL, Tsyben A. Somatotopic arrangement of thermal sensory regions in the healthy human spinal cord determined by means of spinal cord functional MRI. *Magn Reson Med* 2012;68:923–31.
- [71] Stroman PW, Wheeler-Kingshott C, Bacon M, Schwab JM, Bosma R, Brooks J, Cadotte D, Carlstedt T, Ciccarelli O, Cohen-Adad J, Curt A, Evangelou N, Fehlings MG, Filippi M, Kelley BJ, Kollias S, Mackay A, Porro CA, Smith S, Strittmatter SM, Summers P, Tracey I. The current state-of-the-art of spinal cord imaging: Methods. *NeuroImage* 2014;84:1070–81.
- [72] Summers PE, Ferraro D, Duzzi D, Lui F, Iannetti GD, Porro CA. A quantitative comparison of BOLD fMRI responses to noxious and innocuous stimuli in the human spinal cord. *NeuroImage* 2010;50:1408–15.
- [73] Swett JE, Woolf CJ. The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1985;231:66–77.
- [74] Takahashi Y, Chiba T, Kurokawa M, Aoki Y. Dermatomes and the central organization of dermatomes and body surface regions in the spinal cord dorsal horn in rats. *J Comp Neurol* 2003;462:29–41.
- [75] Takahashi Y, Nakajima Y. Dermatomes in the rat limbs as determined by antidromic stimulation of sensory C-fibers in spinal nerves. *PAIN* 1996;67:197–202.
- [76] Thibault K, Calvino B, Pezet S. Characterisation of sensory abnormalities observed in an animal model of multiple sclerosis: a behavioural and pharmacological study. *Eur J Pain* 2011;15:231.e1–16.
- [77] Thibault K, Calvino B, Rivals I, Marchand F, Dubacq S, McMahon SB, Pezet S. Molecular mechanisms underlying the enhanced analgesic effect of oxycodone compared to morphine in chemotherapy-induced neuropathic pain. *PLoS One* 2014;9:e91297.
- [78] Thibault K, Carrel D, Bonnard D, Gallatz K, Simon A, Biard M, Pezet S, Palkovits M, Lenkei Z. Activation-dependent subcellular distribution patterns of CB1 cannabinoid receptors in the rat forebrain. *Cereb Cortex* 2013;23:2581–91.
- [79] Tiran E, Ferrier J, Deffieux T, Gennisson JL, Pezet S, Lenkei Z, Tanter M. Transcranial functional ultrasound imaging in freely moving awake mice and anesthetized young rats without contrast agent. *Ultrasound Med Biol* 2017;43:1679–89.
- [80] Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:823–36.
- [81] Tsurugizawa T, Tamada K, Ono N, Karakawa S, Kodama Y, Debacker C, Hata J, Okano H, Kitamura A, Zalesky A, Takumi T. Awake functional MRI detects neural circuit dysfunction in a mouse model of autism. *Sci Adv* 2020;6:eav4520.
- [82] Uludağ K, Blinder P. Linking brain vascular physiology to hemodynamic response in ultra-high field MRI. *NeuroImage* 2018;168:279–95.
- [83] Urban A, Dussaux C, Martel G, Brunner C, Mace E, Montaldo G. Real-time imaging of brain activity in freely moving rats using functional ultrasound. *Nat Methods* 2015;12:873–8.
- [84] Vergari C, Rouch P, Dubois GJR, Bonneau D, Dubouset JF, Tanter M, Gennisson JL, Skalli W. Intervertebral disc characterization by shear wave elastography: an in vitro preliminary study. *Proc Inst Mech Eng H* 2014;228:607–15.
- [85] Waibl H. Zur Topographie der Medulla spinalis der Albinoratte (*Rattus norvegicus*)/Contributions to the Topography of the Spinal Cord of the Albino Rat (*Rattus norvegicus*). 1973. Available at: <http://link.springer.com/openurl?genre=book&isbn=978-3-540-06344-5>. Accessed February 26, 2020.
- [86] Weber KA, Chen Y, Wang X, Kahnt T, Parrish TB. Functional magnetic resonance imaging of the cervical spinal cord during thermal stimulation across consecutive runs. *NeuroImage* 2016;143:267–79.
- [87] Wilson P, Kitchener PD. Plasticity of cutaneous primary afferent projections to the spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 1996;48:105–29.
- [88] Woolf CJ, Fitzgerald M. Somatotopic organization of cutaneous afferent terminals and dorsal horn neuronal receptive fields in the superficial and deep laminae of the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 1986;251:517–31.
- [89] Yang P-F, Wang F, Chen LM. Differential fMRI activation patterns to noxious heat and tactile stimuli in the primate spinal cord. *J Neurosci* 2015;35:10493–502.
- [90] Zhao F, Williams M, Meng X, Welsh DC, Coimbra A, Crown ED, Cook JJ, Urban MO, Hargreaves R, Williams DS. BOLD and blood volume-weighted fMRI of rat lumbar spinal cord during non-noxious and noxious electrical hindpaw stimulation. *NeuroImage* 2008;40:133–47.
- [91] Zhao F, Williams M, Welsh DC, Meng X, Ritter A, Abbadie C, Cook JJ, Reicin AS, Hargreaves R, Williams DS. fMRI investigation of the effect of local and systemic lidocaine on noxious electrical stimulation-induced activation in spinal cord. *PAIN* 2009;145:110–19.

The Supplementary Eye Field Tracks Cognitive Efforts

Julien Claron¹, Julie Royo², Fabrice Arcizet³, Thomas Deffieux¹, Mickael Tanter^{1*} & Pierre Pouget^{2*}

¹ Physics for Medicine, ESPCI, INSERM, CNRS, PSL Research University, Paris, France.

² Institut du Cerveau, INSERM 1127, CNRS 7225 Sorbonne Université, Paris, France.

³ INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Sorbonne Université, Paris, France.

* These authors jointly supervised the work

ABSTRACT

Pupil dilation is known to be an index of cognitive effort. Nevertheless, our lack of knowledge of the precise dynamics through which pupil size and activity of the medial prefrontal cortex are conjugated during cognitive tasks highlights the need for its further investigation before, during, and after changes in pupil size. Here, we tested whether pupil dynamics are related to the activity of the supplementary eye field (SEF) during a mixed pro/anti-saccade oculomotor task in two macaque monkeys. We used functional ultrasound imaging (fUS) to examine temporal changes in brain activity at the 0.1-s time scale and 0.1-mm spatial resolution in relation to behavioral performance and pupil dynamics. By combining the pupil signals and real-time imaging of NHP during cognitive tasks, we were able to infer localized CBV responses within a restricted part of the dorsomedial prefrontal cortex, referred to as the SEF, an area in which anti-saccade preparation activity is also recorded. Inversely, SEF neurovascular activity measured by fUS imaging was found to be a robust predictor of specific variations in pupil diameter over short and long time scales. Furthermore, we directly manipulated pupil diameter and CBV in the SEF using reward and cognitive effort. These results demonstrate that the SEF is an underestimated but pivotal cortical area for the monitoring and implementation of cognitive effort signals.

Seminal studies revealed that pupil dilation varies with increasing task demands, including perception, attention, task consolidation, learning, and memory¹⁻⁶. Two dominant interpretations for these findings have been proposed. Numerous authors concluded that pupil dilation reflects the demands of a task, whereas others took it a step further and proposed that pupil dilation actually reflects the effort exerted in response to such demands^{1,2,7}. The precise neural substrates by which such cognitive processes influence pupil diameter are still unclear, but inputs from the dorsal part of the medial prefrontal cortex (dmPFC), which mediates arousal, are likely involved.

The dmPFC contains the frontal eye fields (FEF), supplementary motor area (SMA), and supplementary eye field (SEF). The FEF is known to be involved in the control of eye movements and attention and recent studies have shown that the amplitude of pupil responses depends on the combination of the light stimulus and subthreshold FEF electrical microstimulation^{8,9}. Strongly interconnected to the FEF and anterior cingulate cortex (ACC), the SEF is a key region that integrates attentional, short memory, and oculomotor tasks^{10,11}. The SEF also directly projects to the brainstem oculomotor nucleus. In principle, the ACC, SEF, and FEF networks may directly modulate the olivary pretectal nucleus, which encodes retinal illumination and directly activates the pupil-constrictor pathway. Alternatively, or in addition, the ACC, SEF, and ACC networks may act indirectly through the occipital visual cortical areas, in which the visual responses are modulated by FEF and may, in addition to programming the oculomotor plan, participate in the pupil light reflex (PLR). Although the function of the SEF in oculomotor tasks is reasonably well defined, the relationship between SEF activity and pupil dynamics is still unknown.

Pupil dynamics have been studied during preparation and before the execution of eye movements during oculomotor protocols¹², suggesting valid qualities for ongoing cortical processes. In the context of the anti-saccade task, subjects are instructed before the appearance of a stimulus to either automatically look at the peripheral stimulus (pro-saccade) or suppress the automatic response and voluntarily look in the opposite direction from the stimulus (anti-saccade). In this type of paradigm, pupil size was found to be larger in preparation for correct anti-saccades than in preparation for correct pro-saccades and erroneous pro-saccades made in the anti-saccade condition¹³. When an incorrect saccade is executed with latencies in the range of express saccades, execution of the movement indicates that subjects are unable to

inhibit involuntary actions, whereas they have no difficulties in generating voluntary saccades if they correct such directional errors. Given that the SEF is known to be critically involved in the production of antisaccades¹⁴, the precise dynamics through which pupil size and SEF activities are conjugated merits further investigation before, during, and after pupil size modulation.

This question can be addressed using modern neuroimaging techniques, such as functional ultrasound (FUS) imaging. This innovative imaging technique allows very precise mapping of fine temporal changes in brain neurovascular activity at high spatial resolution in large cortical areas in non-human primates^{15,16}. In the present series of experiments, we tested whether pupil dynamics are linked to SEF activity during an anti-saccade task on awake monkeys.

We obtained two primary results: 1) SEF activity is a robust predictor of specific variations of pupil diameter over both short (milliseconds) and long (minutes) time scales and 2) strong covariations of pupil diameter and CBV can be selectively observed in the SEF by manipulating reward and cognitive effort.

RESULTS

We recorded SEF activity by fUS imaging in two monkeys (n = 26 sessions for Monkey S and n = 20 sessions for Monkey G) trained to perform a pro/anti-saccade task (Fig.1.a). Both monkeys performed the task reliably across all recording sessions and the average correct rate of both monkeys was approximately 85% (Figs.1.b and 1.c). The two monkeys showed significant shorter latencies for pro-saccades than anti-saccades, confirming a higher cognitive effort when an anti-saccade was planned (Monkey S: 197 ± 15 ms for pro-saccades, 262 ± 10 ms for anti-saccades, $p = 7e-9$; Monkey G: 218 ± 32 ms for pro-saccades, 267 ± 24 for anti-saccades, $p = 2e-4$, using Wilcoxon's rank test). All trials were used for our analysis regardless of their nature (pro-saccades versus anti-saccades, right vs. left) or whether they were successful.

1 – Determination of the functionally activated area without choosing *a priori*

We wished to investigate the relationship between pupil size and brain activity without any *a priori* choice concerning the activated area. We thus applied the generalized linear model to the fUS data using pupil diameter as the input matrix. In total, 600 trials

were used for these analyses and the time between each trial was a random interval of 3 to 4 s determined after each trial. We constructed the input matrix by realigning all pupil diameters with the target presentation time and took the value of the pupil diameter at the first local maxima. Indeed, the pupil diameter was higher for the first trials (in blue in Figs. 2.a and 2.d) than for the last (in red in Figs. 2.a and 2.d). We compensated for this observed decrease in pupil diameter during the trials by using the pupil diameter at maximum dilation (at 0.8 s for monkey S, (Fig 2.a) and 0.6 s for monkey G. (Fig 2.d). The highlighted pixels in Fig 2.b and Fig 2.e are those for which $p < 0.05$ (before Bonferroni correction), indicating that the pixels highly correlated with the pupil diameter in our cortical imaging plane. In these activated pixels, mostly consisting of the surface of the cortex, we found the activated area to be in the SEF, bilaterally for monkey S and mostly in the left area for monkey G. Such activation is consistent with the Paxinos atlas for the localization of the SEF. High correlations of the fUS signals with the pupil diameter were found in the SEF regions for both animals. Finally, we extracted the cerebral blood volume (CBV) temporal signal from our fUS data by spatially averaging the signal isolated in the functionally activated area (Figs. 2.c. and 2.f). The correlation between CBV and pupil signals occurred over short time scales, as the fUS signal exhibited a large and sharp increase in CBV in response to the single first trial (zoom in Figs. 2c and 2f) of each task. This sharp increase in CBV is consistent with the results of previous studies¹⁵.

2 – Long-term covariation of CBV in the SEF and pupil diameter

During the successive trials of a non-reward-modulated pro-saccade and anti-saccade task, we observed a large and reproducible decrease in the relative CBV (rCBV) of the SEF, defined anatomically using the monkey brain atlas and functionally using the GLM, as previously described (Figs. 2.c and 2.f) ($-23 \pm 2\%/h$ for Monkey S and $-21 \pm 5\%/h$ for Monkey G) after the initial step¹⁵. Given the strong correlation between pupil size and cognitive engagement in the task, we examined the pupil diameter after a pro-saccade or anti-saccade task. We also observed a large and reproducible decrease in pupil diameter throughout the duration of the session (Figs. 2.g and 2.h, $-9.3 \pm 0.3\%/h$ for Monkey S and $-9.7 \pm 3.1\%/h$ for Monkey G) on a long time scale. The decreases in pupil size correlated with the change in activity of the SEF. Furthermore, we compared the squared Pearson's r^2 correlation coefficient between three regions of the brain (SEF, ACC, and a control area, anatomically chosen for the SEF and ACC

and to be the non-activated cortical area farthest from the SEF) and the pupil signal. The r^2 was significantly higher (using a linear mixed-effects statistical model) in the SEF (0.30 ± 0.03 , sem) than in the ACC (0.11 ± 0.02 , sem) or control area (0.10 ± 0.02) (Fig. 2.i). Such a correlation between the activity in the SEF and pupil diameter has not yet been reported.

3 –Timing of the SEF and pupil activities

First, we determined whether SEF activity and pupil dynamics were simultaneous or whether one activity occurred before the other. This required that we first determine the hemodynamic response function (HRF) describing the neurovascular coupling for each of the monkeys. We thus averaged the activity in the SEF area during a task and fitted it with a gamma-inverse density function for each primate to establish the HRF for each ($n = 9$ sessions for Monkey S and $n = 7$ sessions for Monkey G over the first few sessions. Sessions were kept if the non-linear fitting algorithm managed to converge in less than 400 iterations). We obtained the parameters and individual fits by session and plotted the average (Figs. 3.a and 3.d). We performed the same type of experiment to determine the pupillary light response function (PLR) (represented in Figs. 3.b and 3.f) in which the minimum of the function represents the lag of the pupil response (440 ms for Monkey S and 480 ms for Monkey G). For example, we superimposed the pupil (Figs. 3.c and 3.g; red) and hemodynamic (Fig. 3.c. and 3.g; grey) responses for one session to search for a shift in the SEF hemodynamics and pupil activities. Comparison between the histogram of each fUS peak for each trial, minus the peak of the HRF, and the histogram for pupil peak for each trial, minus the peak of the PLR for the pupil, showed a lag between the CBV and pupil response (Figs. 3.d and 3.h), suggesting that the two events do not occur at the same time in the brain. On average, the SEF responses were found to precede the pupil responses.

Then, we directly modulated the level of reward and cross-compared the reward levels with the cognitive effort of each trial to manipulate task engagement and further examine the relationship between variations in pupil diameter and SEF activity. Modulation of the reward was reflected in both changes in pupil diameter and SEF activity. We next examined the association between cognitive effort and SEF activity.

4 - Reward magnitude and task difficulty modulate SEF activity and pupil diameter

We then measured engagement in the task by slightly adapting our paradigm by adding a color code at the fixation point on each given block of 100 trials and modifying the magnitude of the reward. The potential reward delivered for each correct pro- or anti-saccade was red for 0.5 reward units, blue for 1.0 reward unit, and green for 1.5 reward units (Figs. 4.a and 4.b). During the task, the Δ CBV changed during the transition from one reward level to another, as did pupil dilation.

We wanted to quantify pupil dilation and the Δ CBV during such transitions. We computed the transition between the two levels of reward by computing the average CBV and pupil diameter for 10 trials before the transition and 10 trials after. The difference between the values after versus before the transition gives the increase or decrease induced by the transition (Fig. 4.c for Monkey S and Fig. 4.d for Monkey G). Pupil dilation decreased in the transition from a higher to lower reward and increased in the transition from a lower to higher reward (Fig. 4.e). We observed an increase in the Δ CBV in the SEF during a transition from a lower to higher reward, but no statistically significant measure was obtained for a transition from higher to lower reward (Fig. 4.f., in blue)

Interestingly, we observed a marginal effect on the ACC (Fig. 4.f, in red) for the reward transition from 0.5 units to 1.5 units and 1.5 units to 0.5 units. More rostral investigations of the ACC would be required to measure such effects in this area. A control area showed no augmentation or decrease (Fig. 4.f, in green). Finally, increasing the reward resulted in augmentation of both pupil dilation (Fig. 4.e) and Δ CBV in the SEF (Fig. 4.f, blue). Overall, the fUS activity in the SEF was strongly modulated in real-time by the reward, as was pupil size, showing that the SEF may play a role in the cognitive efforts for such demanding oculomotor tasks.

DISCUSSION

We combined pupil signals and real-time imaging of NHP during cognitive tasks, which allowed us to infer localized CBV responses within a restricted part of the dorsomedial prefrontal cortex, referred to as the SEF, an area in which anti-saccade preparation activity is also recorded. Inversely, SEF neurovascular activity measured by fUS imaging was found to be a robust predictor of specific variations in pupil diameter over short and long time scales. The manipulation of reward and cognitive efforts performed

by the animals resulted in strong temporal covariation of pupil diameter and CBV within the SEF. Overall, these results show the region of the SEF to be an underestimated pivotal element within the medial frontal cortex of primates for monitoring and implementing the cognitive effort signals observed within autonomous networks.

In previous studies, SEF neurons have been shown to participate in the selection of eye movements by representing the context-dependent action value of various possible oculomotor behaviors¹⁷. However, the SEF alone does not have the aptitude to directly select eye movements¹⁷. In the same vein, the SEF does not directly participate in the rapid inhibitory control of eye movements in response to sudden changes in task requirements. Our results showing covariations of pupil diameter and CBV within the SEF have important implications because variations in pupil diameter have been observed for a variety of tasks¹⁻⁵. Two principal explanations have been provided to account for such pupil-effort covariation. First, a direct “bottom-up” influence on decisions to produce a bias towards accepting an effort. This would be consistent with the widely held view that the strength of neural representations for choice attributes directly influence the decision. For example, it has been shown that intensifying encoded rewards through the simulation of future episodic events is linked with decisions that promote higher long-term payoffs and even increase prosocial behavior.

As for neural implementation, phasic locus coeruleus (LC) activity is known to transmit feedforward information to the SEF via ascending projections to the prefrontal cortex (PFC), providing a plausible pathway for such a bottom-up influence. Neural readout of the autonomous activation associated with arousal could provide an additional mechanism by which the arousal signal observed here may bias choices, serving as a signal that the organism is indeed ready to accept the physical challenge.

In the ACC, unlike the SEF, there was not even a tendency of heightened CBV modulation under conditions of cognitive effort. This finding is compatible with an earlier report showing that ACC neurons in the monkey are not selectively active during the countermanding of saccades, an operation assumed to involve cognitive effort and inhibition of action¹⁸. However, it stands in sharp contrast to a large body of literature, based on functional MRI imaging in humans, indicating that activation in the ACC is strongly heightened under conditions of effort¹⁹⁻²².

There are several possible explanations for this discrepancy. There may be a species-specific difference, such that neurons in the human ACC monitor cognitive effort, whereas those in the monkey ACC do not. This seems improbable because, in general, anatomically homologous areas appear to serve similar functions in the two species²³. This cannot, however, be altogether ruled out. The human ACC possesses a cell type not found in the monkey ACC²⁴ and, therefore, may serve a function not served by the monkey ACC. It is possible that our recording sites lay outside the region of the ACC responsible for effort-related activity²⁵. This also seems improbable because we deliberately recorded in the subregion that is connected to the SEF²⁶ and in which, accordingly, it would be most reasonable to expect to find activity sensitive to cognitive effort in an oculomotor task. It is also possible that the cognitive-specific bold signals detected in human fMRI studies are related to neural events other than spiking activity and CBV, for example, presynaptic potentials²⁷. It may be the case that ACC activity, even in humans, does not exhibit enhanced spiking activity under conditions of cognitive effort. For the ACC to serve a cognitive effort and alert the rest of the cortex to the presence of cognitive effort would require enhanced spiking activity because spikes are the currency used between the ACC and other cortical areas. Thus, the remaining conclusion is that the ACC does not monitor cognitive effort.

Overall, our observations are consistent with a possible top-down influence from the SEF to the noradrenaline arousal system, which may serve to transmit information about the commitment to overcome a great physical demand, thus resulting in automatic accelerating upregulation of arousal states to prepare the organism for the upcoming challenge associated with the recent choice. As SEF activity precedes pupil modulation, our results also allow us to conclude that within the medial frontal cortex of primates, aside from the ACC, the SEF may also play a pivotal role in the implementation of the cognitive effort signals observed within autonomous networks.

Acknowledgments

We thank Jeffrey Schall and Jérôme Sallet for helpful comments on earlier versions of the manuscript. This work was funded by a research grant from the European Research Council (ERC) under the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007–2013)/ERC Advanced grant agreement no. 339244-FUSIMAGINE and the Fondation Bettencourt-Schueller. It was also supported by the Inserm Accelerator of Technological Research in Biomedical Ultrasound.

METHODS

Animal model and behavioral data. All experiments were ethically approved by the French “Ministère de l’Education, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” under the project reference APAFIS #6355-2016080911065046. Functional data were acquired from two captive-born rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), S and G, trained to perform various types of visual tasks. In the saccade task, the animal has to fix its gaze on the cue object presented on the right or left side of the screen; in the anti-saccade task, it has to fix its gaze on the opposite side from where the cue appeared. Each animal performed at baseline (200 to 220 s, random) followed by saccades and anti-saccades (randomized) over 1 h. During data acquisition, the eye position of the primate was monitored at 1 kHz using an infrared video eye tracker (Eyelink 1k, SR-Research), which enabled live control of the behavioral paradigm and the delivery of a reward based on the success or failure of a visual task²⁸.

Experimental setup

We recorded 46 sessions (26 for Monkey S and 20 for Monkey G) of pro-saccade and anti-saccade tasks, with two kinds of sessions (Fig. 1).

The conventional session, without reward modulation, consisted of only a blue square before the pro-saccade or anti-saccade cue and the reward was kept constant within and between all sessions. For the second type of task, with reward modulation, the same basal reward was retained and the animal was presented with three colored dots (red for 0.5 reward unit, blue for 1 reward unit, and green for 1.5 reward unit) before the pro-saccade or anti-saccade cue. Behavioral data, such as pupil diameter, were recorded with an EyeLink system and cerebral blood volume (CBV) using a functional ultrasound scanner for all sessions.

All tasks were driven by EventIDE software (OkazoLab, Netherlands).

The reward was calibrated to the weight of the primate and the model of the rewarding tube (approximately 30 ms/kg), which delivered sugary water. Primates were under mild fluid restriction (approximately 30 mL/kg/day) and could drink *ad libitum* while working.

Implant and probe for functional ultrasound imaging for awake cooperative monkeys. The head of the monkey was fixed using a surgically implanted titanium head post (Crist Instrument, MD, USA). After behavioral training of the animals, a recording chamber (CILUX chamber, Crist Instrument, MD, USA) was implanted and a craniotomy (diameter 19 mm) was performed (mediolateral: +0 mm, anteroposterior : +26 mm). A custom ultrasonic probe (128 elements, 15 MHz, 100 x 100 μm^2 of spatial resolution) with sterile ultrasonic gel was used in the chamber. The acquired images had a pixel size of 100 x 100 μm and a slice thickness of 400 μm .

Functional ultrasound (fUS) recording. Changes in CBV were measured using a real time functional ultrasound scanner prototype (Iconeus and Inserm U1273, Paris, France) with a 15-MHz linear probe. Data were acquired by emitting continuous groups of 11 planar ultrasonic waves tilted at angles varying from -10° to 10° . Ultrasonic echoes were summed to create a single compound image acquired every 2 ms. Final Doppler images were created by averaging 200 compound ultrasonic images after spatiotemporal filtering based on the singular value decomposition of the ultrasonic images.

Eye movements and pupil recordings. Eye movements and pupil diameter were recorded during the tasks using a video eye tracker (Eyelink 1k, SR-Research) connected to an analog-to-digital converter (Plexon Inc, TX, USA). All data were collected using Plexon software and analyzed using MATLAB (The MathWorks Inc., Massachusetts, USA). Saccades were detected when the eye's horizontal velocity went over $30^\circ.\text{s}^{-1}$.

Data processing.

Generalized linear model. Doppler data were analyzed using a generalized linear model approach implemented in Matlab. The stimulation pattern in the design matrix was convoluted with the fUS-determined HRF and a Z-score and p-value map were obtained. The activation maps show the Z-score of all pixels in the images with a p-value < 0.05 (before Bonferroni correction). We chose the region of interest (ROI) within the supplementary eye field based on the Z-score map and Paxinos atlas for macaque brains and the signal was averaged to obtain a single temporal signal. The spatially averaged signal was then expressed as the relative increase in CBV (in

percent) by subtracting the baseline CBV (calculated during the baseline at the beginning of an acquisition) followed by division of the difference by the baseline CBV.

Determination of the pupil diameter. The pupil diameter was expressed in percent by subtracting the baseline value and then dividing the difference by the baseline value (in which we excluded all blinks and moments in which the eyes were closed). We then determined the maximum dilation diameter following a task by realigning the pupil diameter at the onset of the cue presentation. We chose the 1st local maximum of the pupil diameter (0.8 s after target onset for Monkey S and 0.6 s after target onset for Monkey G) to extract the pupil diameter for the i^{th} trial.

Fitting of the hemodynamic response. The hemodynamic response was determined by averaging the CBV response of all trials and fitting the average by an inverse-gamma probability distribution the using MATLAB *lsqcurvefit* (Optimization Toolbox) algorithm for least square non-linear fitting, as previously described by other authors²⁹.

Determination of the pupillary light response. The Pupillary light response (PLR) was determined over 1 single session by averaging the pupil diameter response to a short white flash (200 ms) after fixation (250 ms). The flash was followed by a black screen for 4 s to ensure that the pupil returned to the basal state before the following fixation/flash.

Statistical analysis of the hemodynamic responses. Statistical analysis between two groups were performed using the Wilcoxon rank test, due to the non-normality of our data, using the Matlab *ranksum* function, the null hypothesis being no statistical difference between the two groups. If more than two groups were available and the data hierarchically organized, we used a linear mixed statistical model. Data were homogenized using a square root transformation and the variance of homogeneity assessed using the Bartlett test and residual normality the Shapiro-Wilk test.

1. Hess, E. H. & Polt, J. M. Pupil Size in Relation to Mental Activity during Simple Problem-Solving. *Science* **143**, 1190–1192 (1964).
2. Kahneman, D. & Beatty, J. Pupil diameter and load on memory. *Science* **154**, 1583–1585 (1966).
3. Andreassi, J. L. *Psychophysiology: Human Behavior & Physiological Response*. (Psychology Press, 2013).
4. Beatty, J. & Lucero-Wagoner, B. The pupillary system. in *Handbook of psychophysiology*, 2nd ed 142–162 (Cambridge University Press, 2000).
5. Laeng, B., Sirois, S. & Gredebäck, G. Pupillometry: A Window to the Preconscious? *Perspect. Psychol. Sci. J. Assoc. Psychol. Sci.* **7**, 18–27 (2012).
6. Filipowicz, A. L., Glaze, C. M., Kable, J. W. & Gold, J. I. Pupil diameter encodes the idiosyncratic, cognitive complexity of belief updating. *eLife* **9**, (2020).
7. Kahneman, D. *Attention and effort*. (Prentice-Hall, 1973).
8. Ebitz, R. B. & Moore, T. Selective Modulation of the Pupil Light Reflex by Microstimulation of Prefrontal Cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **37**, 5008–5018 (2017).
9. Lehmann, S. J. & Corneil, B. D. Transient Pupil Dilation after Subsaccadic Microstimulation of Primate Frontal Eye Fields. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **36**, 3765–3776 (2016).
10. Trommershäuser, J., Glimcher, P. W. & Gegenfurtner, K. R. Visual processing, learning and feedback in the primate eye movement system. *Trends Neurosci.* **32**, 583–590 (2009).
11. Schall, J. Visuomotor Functions in the Frontal Lobe. *Annu. Rev. Vis. Sci.* **1**, 150724172340006 (2015).
12. Jainta, S. & Baccino, T. Analyzing the pupil response due to increased cognitive demand: An independent component analysis study. *Int. J. Psychophysiol.* **77**, 1–7 (2010).

13. Wang, C.-A., Brien, D. C. & Munoz, D. P. Pupil size reveals preparatory processes in the generation of pro-saccades and anti-saccades. *Eur. J. Neurosci.* **41**, 1102–1110 (2015).
14. Schlag-Rey, M., Amador, N., Sanchez, H. & Schlag, J. Antisaccade performance predicted by neuronal activity in the supplementary eye field. *Nature* **390**, 398–401 (1997).
15. Dizeux, A. *et al.* Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates. *Nat. Commun.* **10**, 1–9 (2019).
16. Blaize, K. *et al.* Functional ultrasound imaging of deep visual cortex in awake nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 14453–14463 (2020).
17. Stuphorn, V., Brown, J. W. & Schall, J. D. Role of supplementary eye field in saccade initiation: executive, not direct, control. *J. Neurophysiol.* **103**, 801–816 (2010).
18. Ito, S., Stuphorn, V., Brown, J. W. & Schall, J. D. Performance monitoring by the anterior cingulate cortex during saccade countermanding. *Science* **302**, 120–122 (2003).
19. Aben, B., Calderon, C. B., Bussche, E. V. den & Verguts, T. Cognitive Effort Modulates Connectivity between Dorsal Anterior Cingulate Cortex and Task-Relevant Cortical Areas. *J. Neurosci.* (2020) doi:10.1523/JNEUROSCI.2948-19.2020.
20. Westbrook, A., Lamichhane, B. & Braver, T. The Subjective Value of Cognitive Effort is Encoded by a Domain-General Valuation Network. *J. Neurosci.* **39**, 3934–3947 (2019).
21. Ganesh, G., Minamoto, T. & Haruno, M. Activity in the dorsal ACC causes deterioration of sequential motor performance due to anxiety. *Nat. Commun.* **10**, 4287 (2019).
22. Kurniawan, I. T., Guitart-Masip, M. & Dolan, R. J. Dopamine and Effort-Based Decision Making. *Front. Neurosci.* **5**, (2011).
23. Paus, T. Primate anterior cingulate cortex: where motor control, drive and cognition interface. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 417–424 (2001).
24. Allman, J., Hakeem, A. & Watson, K. Two phylogenetic specializations in the human brain. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* **8**, 335–346 (2002).

25. Joshi, S., Li, Y., Kalwani, R. M. & Gold, J. I. Relationships between Pupil Diameter and Neuronal Activity in the Locus Coeruleus, Colliculi, and Cingulate Cortex. *Neuron* **89**, 221–234 (2016).
26. Huerta, M. F. & Kaas, J. H. Supplementary eye field as defined by intracortical microstimulation: connections in macaques. *J. Comp. Neurol.* **293**, 299–330 (1990).
27. Logothetis, N. K. & Wandell, B. A. Interpreting the BOLD signal. *Annu. Rev. Physiol.* **66**, 735–769 (2004).
28. Valero-Cabre, A. *et al.* Frontal Non-Invasive Neurostimulation Modulates Antisaccade Preparation in Non-Human Primates. *PLOS ONE* **7**, e38674 (2012).
29. Lindquist, M. A., Meng Loh, J., Atlas, L. Y. & Wager, T. D. Modeling the hemodynamic response function in fMRI: Efficiency, bias and mis-modeling. *NeuroImage* **45**, S187–S198 (2009).

FIGURES

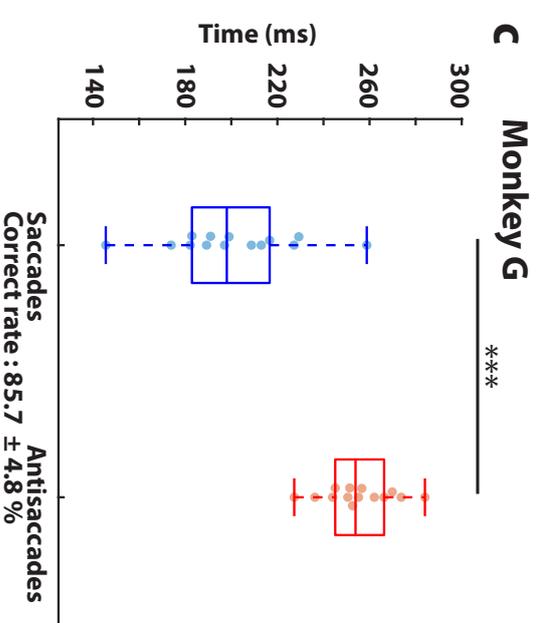
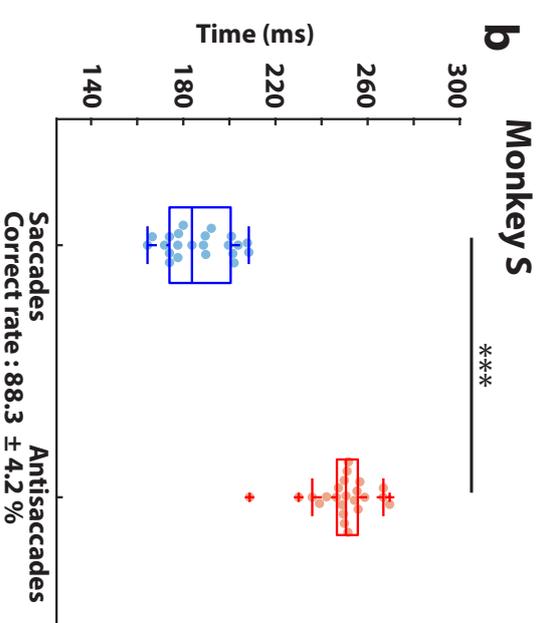
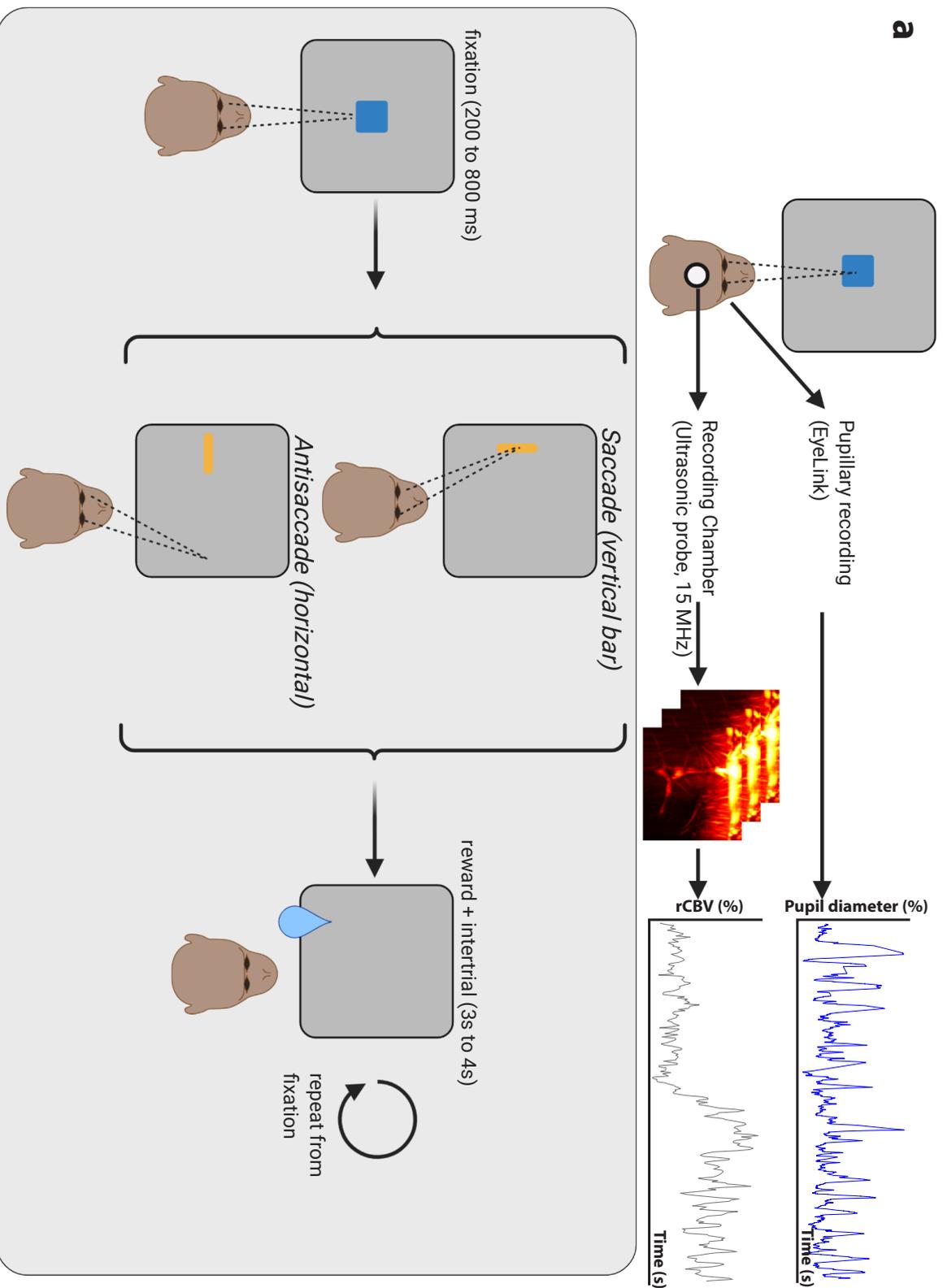
Figure 1. Task timeline. (a) The heads of the monkeys are fixed in a chair with a 15-MHz ultrasonic probe in a recording chamber. An EyeLink recording system records the eye position and pupillary diameter in real time. During the task, there is a baseline of 200 to 220 s (randomized) and a fixation point is shown. If the animal succeeds, a pro-saccade (vertical rectangle) or an anti-saccade (horizontal rectangle) is shown on the screen. Based on the hint, the animal performs a saccade or an anti-saccade and, if he succeeds, receives a reward associated with a specific color of the fixation point (red: 0.5 times the normal reward, blue: 1 time the normal reward, green 1.5 times the normal reward). This block is followed by a grey screen of 3 to 4 s (randomized) used as an intertrial before repeating from the fixation point. (b) The average saccade response time for Monkey S for all sessions was 197.0 ± 15 ms and the anti-saccade response time 262.0 ± 10 ms, with a total correct rate of $88.2 \pm 4.2\%$. (c) The average saccade response time for Monkey G was 218 ± 32 ms, and the antisaccade response time 267 ± 24 ms, with a correct rate of $85.7 \pm 4.6\%$.

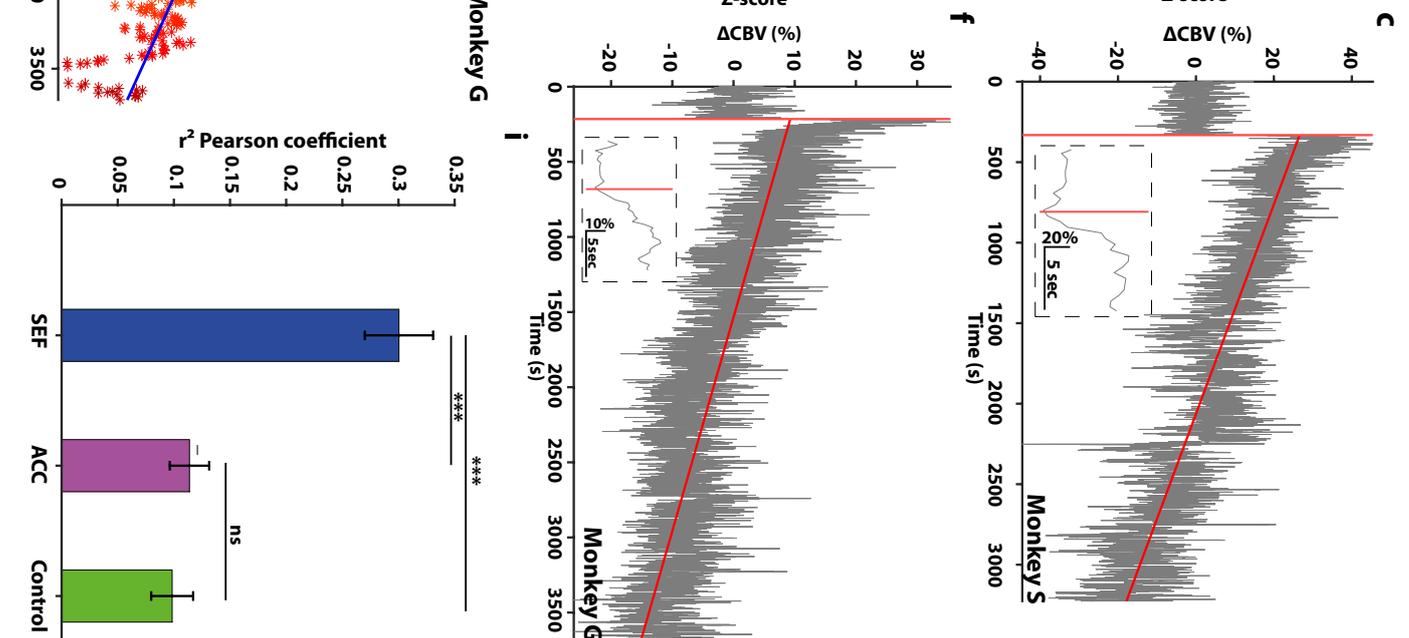
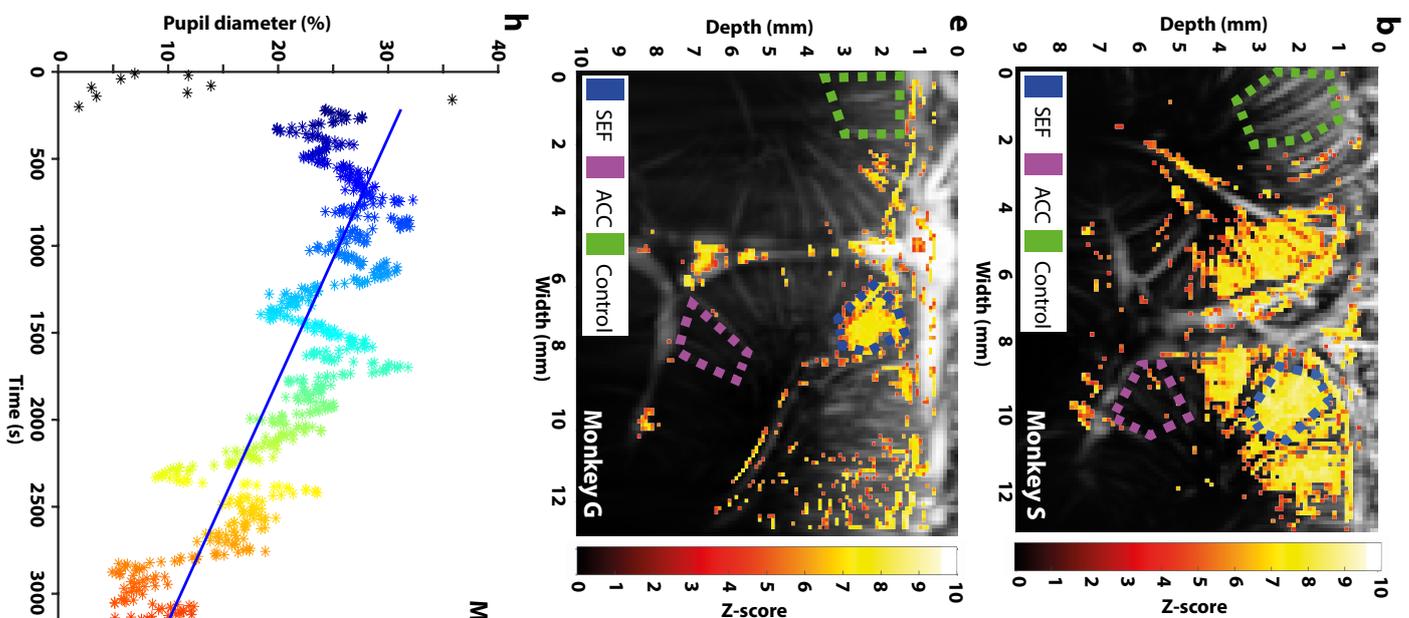
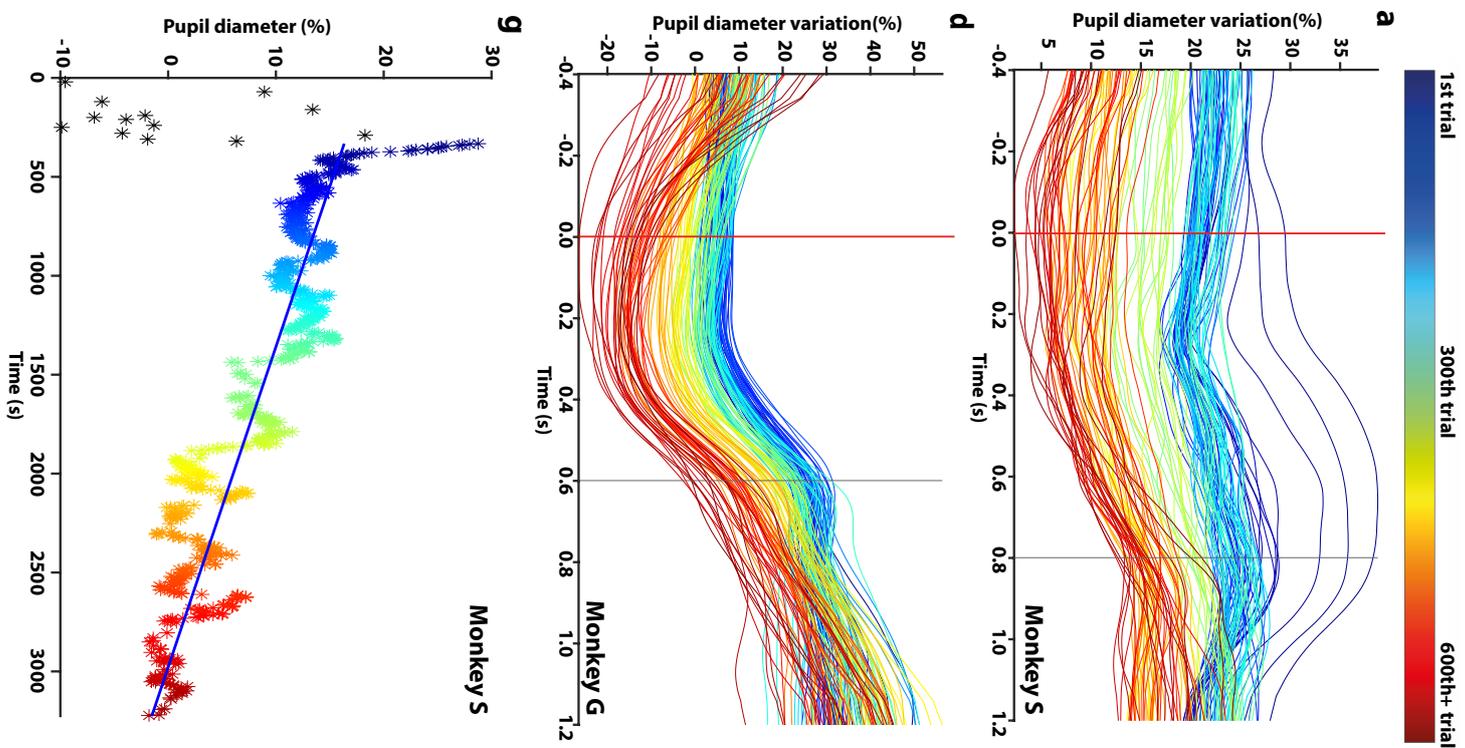
Figure 2. Example of one session for each monkey of the vascular and pupillary responses. (a) Pupillary response over time. The colour represents the number of the trial (blue: 1st trial, red: last trial), whereas the temporal abscissa represents the time prior to the presentation of the saccade or anti-saccade hint. The vertical line represents the chosen time for the maximal dilation (0.8 s for Monkey S). (b) The vascular response of Monkey S using Fig. 2.g as an input matrix for the generalized linear model (GLM). The background image consists of an anatomical image obtained by averaging all the Doppler films. The Z-score map was obtained using the GLM and thresholded using the Bonferroni correction ($p < 0.05$ uncorrected). (c) Example of a CBV response during the starting of a task for Monkey S., showing a step at the end of the baseline and the beginning of the task. The small square represents a zoom on the 1st trial. (d) Same as for 2.a for Monkey G. The vertical line is at 0.6 s after presentation of the hint. (e) Same as for 2.b for Monkey G. using 2.h as an input matrix (f) Same as for 2.c for Monkey G. (g) Maximum pupillary dilation at 0.8 s after presentation of the hint using the same colour code as in B. Black stars represent the pupillary diameter during baseline. (h) Same as for 2.g for monkey G. (i) Pearson's correlation coefficient between pupil diameter (see h and j) and three areas in the brain: SEF (blue), ACC (purple), and Control (green) for all non-reward-modulated sessions for both animals ($n = 21$ sessions for Monkey S, $n = 13$ sessions for Monkey G), *** $p < 0.001$, ns: not significant.

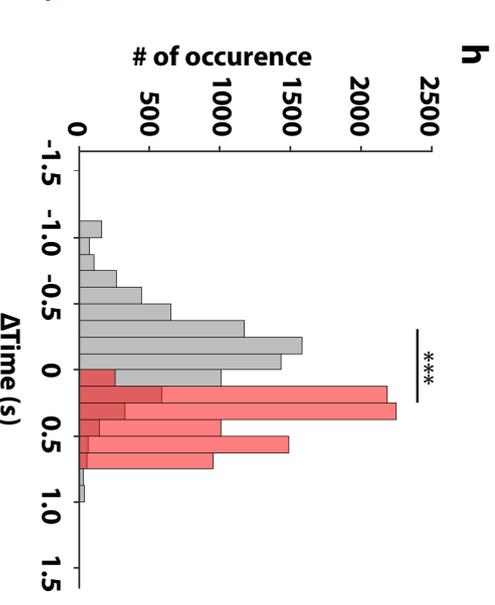
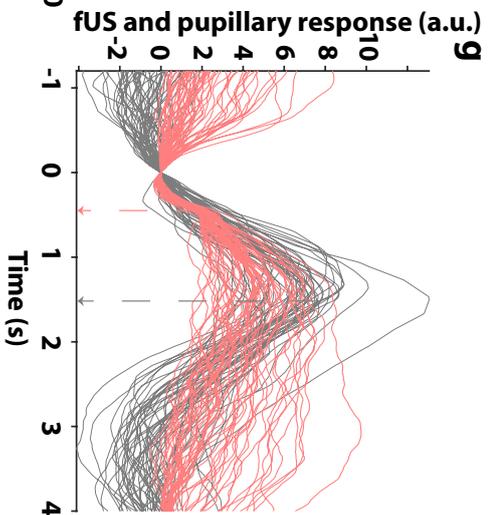
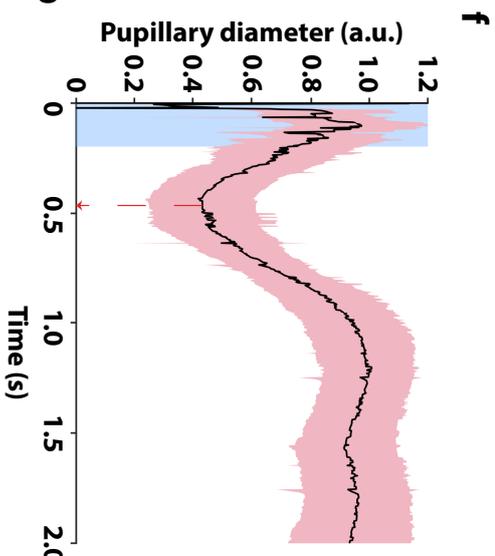
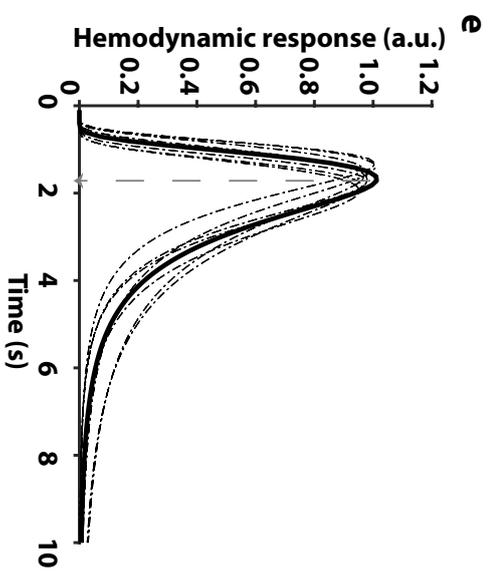
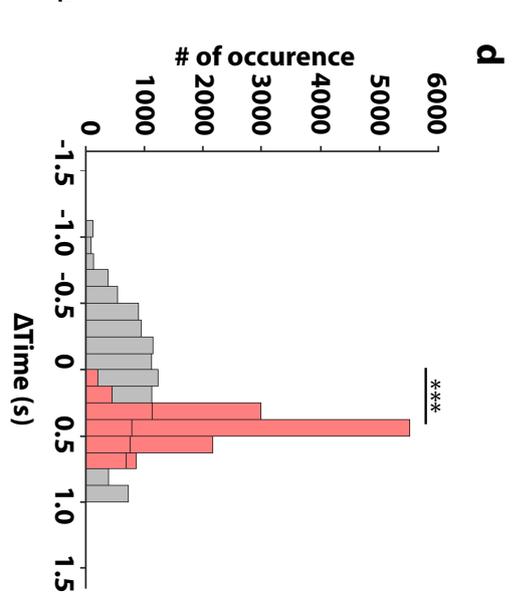
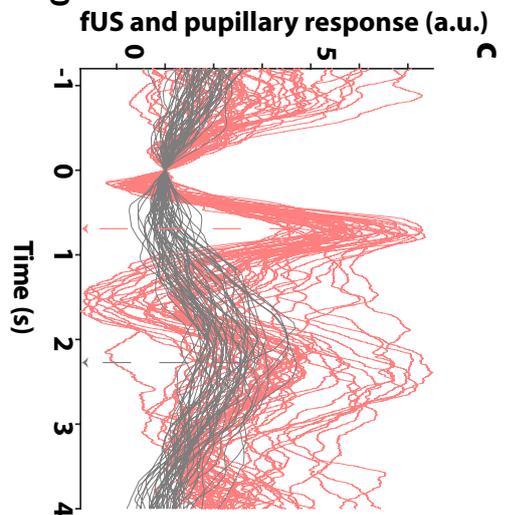
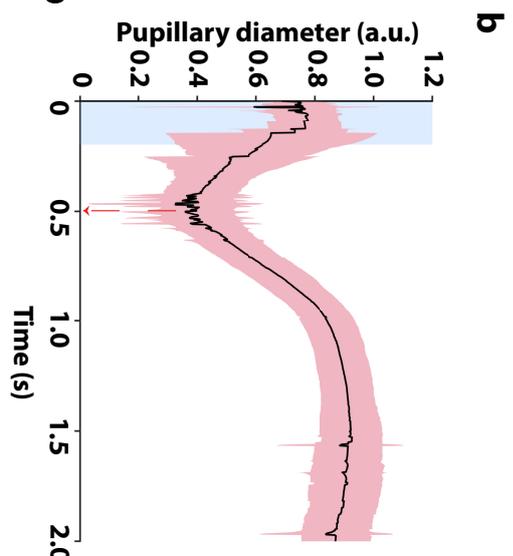
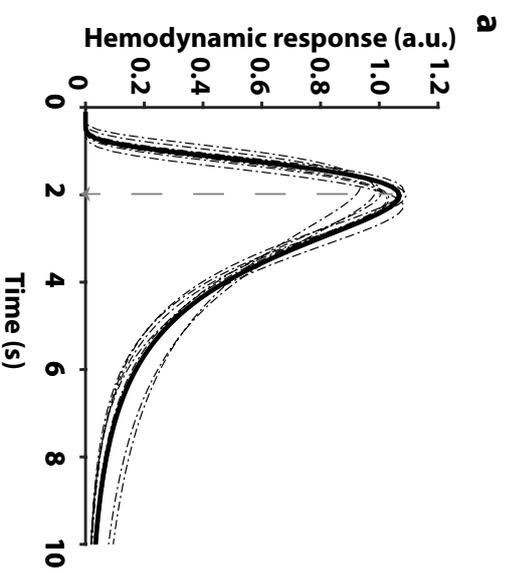
All vertical red bars represent the end of the baseline and the start of the task.

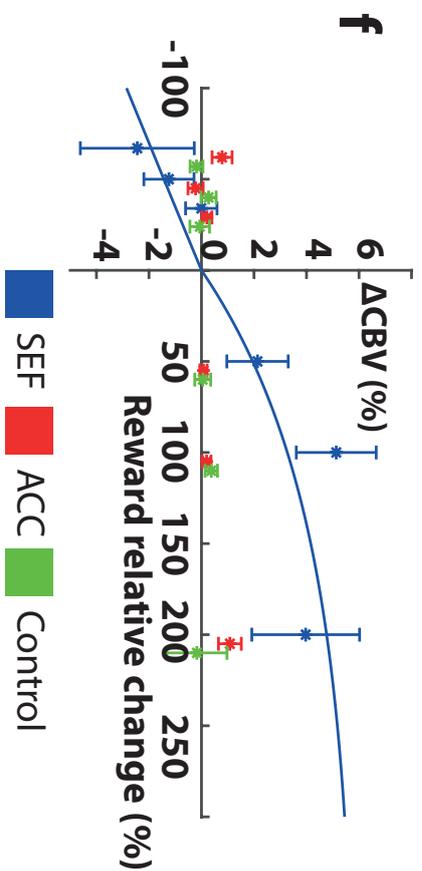
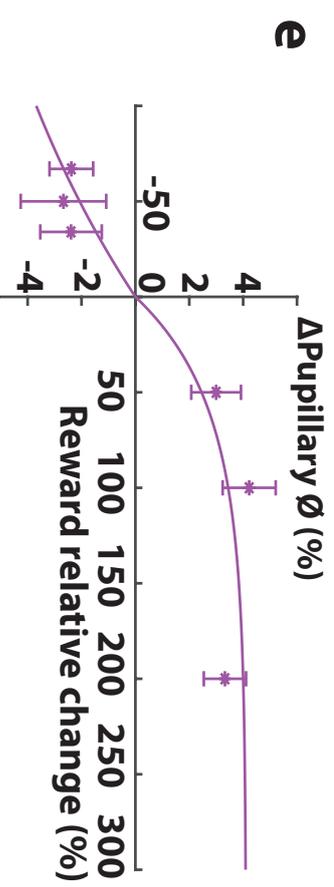
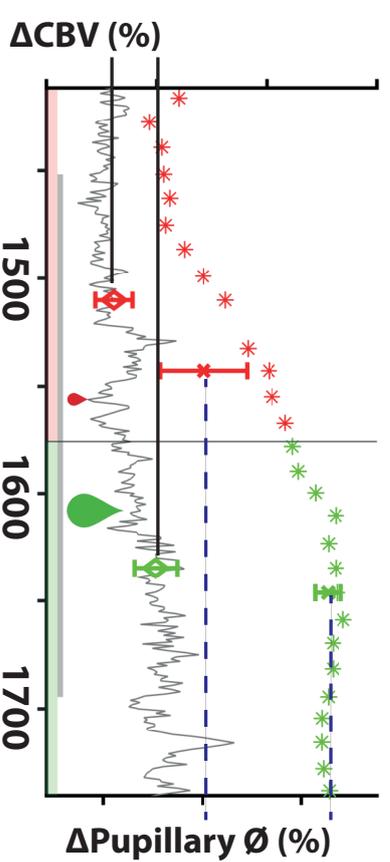
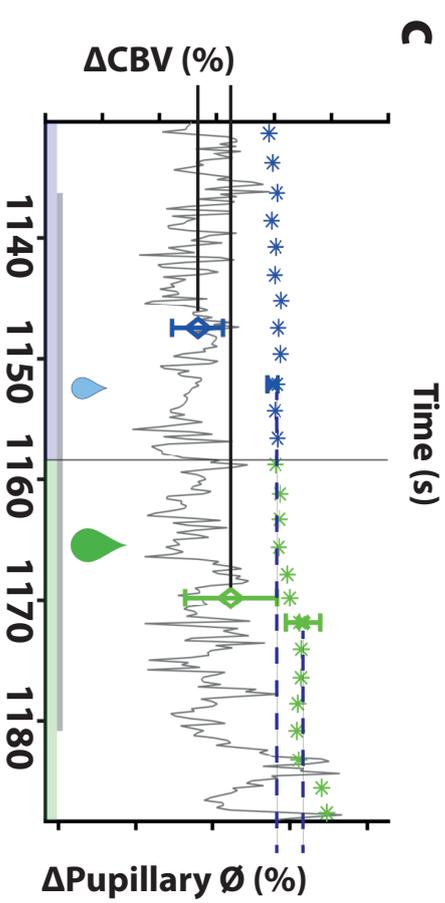
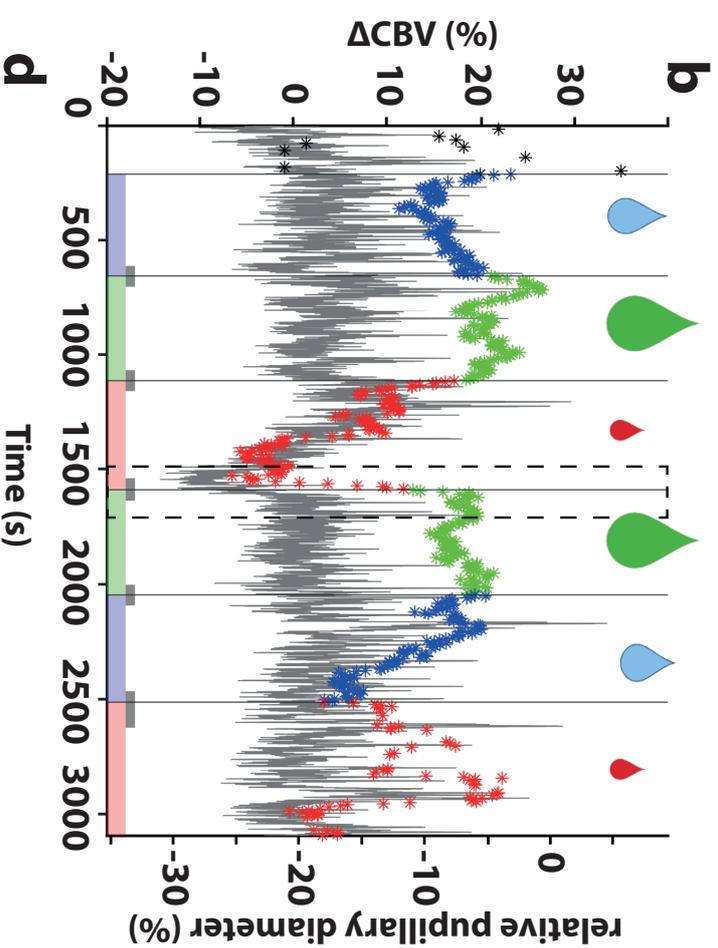
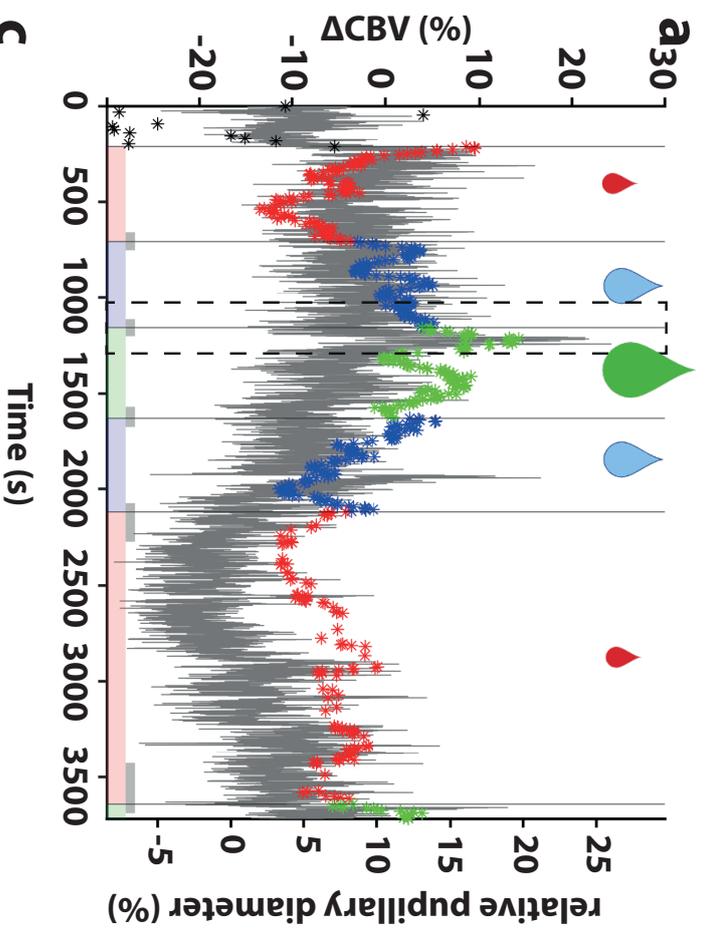
Figure 3. Pupillary and fUS response and comparison of the lag. (a) Hemodynamic response function of Monkey S. The maximum peak occurred at 2.0 s. (b) Pupillary light response of Monkey S. The peak occurred at 0.44 s. The blue rectangle represents the duration of the white flash. (c) Pupillary response (pink) and superimposed vascular response (grey) for each trial. All the data were strictly zeroed at $t = 0$ s. (d) Histogram of pupillary response (red) and fUS response (grey) prior to execution of the saccade minus the max of the HRF and PLR. (e-h) same for Monkey G. The HRF peaked at 1.7 s and the PLR at 0.48 s. $***p < 0.001$ (Wilcoxon's rank test)

Figure 4. Reward modulation during the task for both Monkey S and Monkey G. (a) CBV and pupillary response over one session for Monkey S. The colours represent the quantity of reward obtained after a successful trial (green: 1.5X the base reward, blue: 1X the base reward, and red: 0.5X the base reward). (b) Same as for (a) for Monkey G. (c) Zoom of (a) for one reward transition at approximately 2,500 s. The grey area under the curve represents the last 10 trials before transition and the first 10 trials after transition, which were used to calculate the CBV and pupillary values before and after the transition (diamond for CBV, star for pupil). (d) Same as (c) for Monkey G. (e) Pupil dilation according to the change in reward for monkeys S and G. Mean \pm standard error of the mean. (f) The CBV changed according to the change in reward, all sessions for Monkeys S and G. Blue represent the SEF, red the ACC, and green the control area. Mean \pm standard error of the mean.









RÉSUMÉ

Ces travaux de thèse portent sur les applications de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS) à l'étude de phénomènes neurovasculaires chez le rat et le primate non-humain, notamment l'étude des entrées dans le système nerveux central et à l'intégration de l'information par les centres supérieurs de la cognition. Elle nous a, dans un premier temps, permis d'étudier l'intégration de l'information nociceptive par la moelle épinière chez le rat. Une seconde partie de cette thèse nous a permis, chez le primate non-humain, d'imager un plan fronto-médian contenant les champs oculomoteurs supplémentaires (COS) et le cortex cingulaire antérieur (CCA). Nous avons montré, pour la première fois, que les COS permettent le suivi de la motivation ainsi qu'un rôle du CCA dans la volonté et le libre-arbitre du primate. Finalement, nous nous sommes intéressés au couplage entre deux techniques : le fUS et l'électrophysiologie. L'intérêt majeur des mesures couplées réside dans la capacité de mesurer directement l'activité neuronale locale mais aussi la réponse hémodynamique qui en découle, nous permettant de lier la réponse neuronale à la réponse vasculaire.

MOTS CLÉS

Ultrasons fonctionnels, neuroimagerie, nociception, primate non-humain, motivation, volition, électrophysiologie, couplage neurovasculaire

ABSTRACT

This thesis focuses on the applications of functional ultrasound imaging (fUS) to the study of neurovascular phenomena in rats and non-human primates, in particular the study of inputs into the central nervous system and the integration of information by higher centres of cognition. Initially, it enabled us to study the integration of nociceptive information by the spinal cord in rats. A second part of this thesis allowed us, in the non-human primate, to image a fronto-medial plane containing the supplementary eye field (SEF) and the anterior cingulate cortex (ACC). We showed, for the first time, that the SEF allow the monitoring of motivation as well as a role of the CCA in the will and free will of the primate. Finally, we were interested in the coupling between two techniques: fUS and electrophysiology. The major interest of coupled measurements lies in the ability to directly measure local neuronal activity but also the resulting hemodynamic response, allowing us to link the neuronal response to the vascular response.

KEYWORDS

Functional ultrasound, neuroimaging, nociception, non-human primate, motivation, volition, electrophysiology, neurovascular coupling