



HAL
open science

Imagerie optique speckle du débit sanguin cérébral : développements pour l'imagerie en temps-réel en contexte clinique et préclinique

Marc Chammas

► **To cite this version:**

Marc Chammas. Imagerie optique speckle du débit sanguin cérébral : développements pour l'imagerie en temps-réel en contexte clinique et préclinique. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPAST106 . tel-04260896

HAL Id: tel-04260896

<https://pastel.hal.science/tel-04260896v1>

Submitted on 26 Oct 2023

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.

Imagerie Optique Speckle du Débit Sanguin
Cérébral: Développements pour l'Imagerie en
Temps-réel en Contexte Clinique et Préclinique

*Optical Speckle Imaging of Cerebral Blood Flow:
Developments for Real-time Imaging in Clinical and Preclinical
Contexts*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 575, Electrical, Optical, Bio: Physics and Engineering (EOBE)
Spécialité de doctorat: Physique et imagerie médicale
Graduate School: Sciences de l'ingénierie et des systèmes
Référent: Institut d'Optique Graduate School

Thèse préparée dans l'unité de recherche: Laboratoire Charles Fabry (Université Paris-Saclay, Institut d'Optique Graduate School, CNRS), sous la direction de Frédéric Pain, Maître de Conférence, Laboratoire Charles Fabry, Université Paris-Saclay et la co-direction de Hirc Gurden, Directeur de Recherches, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Université Paris-Cité.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 27 Septembre 2023, par

Marc CHAMMAS

Composition du jury

Membres du jury avec voix délibérative

Alexandra FRAGOLA

Professeure des Universités, ISMO, Université Paris-Saclay

Présidente

Fabrizio ANDREELLI

PU-PH, Sorbonne Université, Hôpital Pitié Salpêtrière

Rapporteur &

Examineur

Angelo PIERANGELO

Professeur des Universités, LPICM, Institut Polytechnique de Paris

Rapporteur &

Examineur

Albertine DUBOIS

Ingénieure de Recherches, INSTN-CEA, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Titre: Imagerie Optique Speckle du Débit Sanguin Cérébral: Développements pour l'Imagerie en Temps-réel en Contexte Clinique et Préclinique

Mots clés: Imagerie du contraste laser speckle, Intelligence artificielle, Réseaux de neurones convolutionnels, Temps-réel, Débit sanguin, Obésité

Résumé: L'obésité a des répercussions importantes sur la santé publique. Chez les personnes obèses, une augmentation de l'inflammation et de la résistance à l'insuline est observée dans le cerveau, ce qui entraîne des problèmes vasculaires cérébraux et une susceptibilité accrue aux maladies neurodégénératives. La fragilité vasculaire peut également entraîner des complications graves telles que les accidents vasculaires cérébraux. Le suivi du débit sanguin est donc crucial dans les pathologies métaboliques. L'imagerie du contraste speckle (LSCI) est une technique à haute résolution largement utilisée en imagerie préclinique, notamment cérébrale, pour cartographier le débit sanguin à la surface des tissus dans des vaisseaux de diamètre compris entre 10 et 500 micromètres. L'approche multi-exposition (MESI) améliore la quantification du débit, en particulier en présence de diffuseurs statiques (i.e. peau, os). L'imagerie MESI possède de nombreux atouts: c'est une technique sans contact avec le tissu, sans traceur et portable au lit du patient. Cependant, sa mise en œuvre nécessite une instrumentation relativement complexe et surtout une post-analyse lourde en temps de calcul, puisqu'elle est basée sur l'ajustement pixel par pixel d'un modèle non-linéaire reliant le contraste speckle au temps de décorrélation des diffuseurs. Ces limites ont jusqu'ici empêché ses applications en clinique, les appareils commerciaux existants reposant tous sur l'approche simple exposition S-LSCI. Dans ce contexte, nous avons évalué deux nouvelles approches instrumentales et méthodologiques pour lever ces verrous. Dans un premier temps, l'acquisition de données MESI en exposition synthétique a été mise en œuvre et comparée à l'exposition modulée classiquement utilisée en MESI. *In vitro*, en utilisant des canaux microfluidiques représentatifs de la physiologie de la microcirculation, et, *in vivo*, sur un modèle murin de l'obésité, nous avons montré que l'acquisition MESI synthétique permet d'évaluer des variations relatives de débit, à condition que l'effet des bruits instrumentaux sur le contraste speckle soient bien évalués et corrigés. La prise en compte des différents biais expérimentaux (sous-échantillonnage spatial et effet des mouvements globaux) a également été étudiée. Dans un second temps, l'utilisation de réseaux neuronaux a été évaluée comme alternative à l'ajustement non-linéaire pour l'extraction des cartes de flux sanguin en temps quasi-réel. Un réseau convolutif (Res3D-Net) a été entraîné et validé à l'aide d'une base de données d'images de contraste speckle expérimentales obtenues en exposition synthétique *in vitro* pour différents débits et différents diamètres de canaux. Il a montré sa capacité à prédire les variations relatives de débit, avec une robustesse et une linéarité supérieure à celle obtenue avec ajustement d'un modèle non-linéaire. Le système MESI optimisé a ensuite été utilisé pour étudier les variations du flux sanguin de la branche de l'artère cérébrale moyenne (MCA) qui irrigue le cortex somatosensoriel en réponse à la stimulation des vibrisses dans un modèle murin d'obésité. L'étude de souris obèses montre l'impact de l'obésité sur la régulation du débit sanguin cérébral et propose des pistes de correction de l'alimentation par équilibrage du rapport ω -3/ ω -6 des acides gras polyinsaturés. En perspectives, des pistes d'améliorations tant instrumentales que méthodologiques sont discutées, notamment en termes de quantification du débit sanguin, pour aboutir à une meilleure évaluation systématique des variations de débits mesurées entre le réseau de neurones et la méthode par ajustement de modèle. Les développements apportés à la technique MESI au cours de cette thèse ouvrent la voie pour l'étude des changements relatifs du débit sanguin au niveau microvasculaire avec une durée d'analyse compatible avec les applications cliniques en temps-réel.

Title: Optical Speckle Imaging of Cerebral Blood Flow: Developments for Real-time Imaging in Clinical and Preclinical Contexts

Keywords: Laser speckle contrast imaging, Artificial intelligence, Convolutional neural networks, Real-time, Blood flow, Obesity

Abstract: Obesity has major repercussions on public health. In obese people, increased inflammation and insulin resistance are observed, leading to cerebrovascular problems and increased susceptibility to neurodegenerative diseases. Vascular fragility can also lead to serious complications such as stroke. Assessment of blood flow regulation is therefore crucial in metabolic disorders. Laser speckle contrast imaging (LSCI) is a high-resolution technique widely used in preclinical imaging, particularly in the brain, to map blood flow at the tissue surface in vessels with a diameter between 10 and 500 micrometers. Multi-exposure speckle imaging (MESI) improves flow quantification, particularly in the presence of static diffusers (i.e. skin, bone). MESI imaging has a number of advantages: it's a contactless (no contact with the tissue), tracer-free technique and portable to the patient's bed. However, its implementation requires relatively complex instrumentation and, above all, computationally-intensive post-analysis, based on pixel-wise fitting of a non-linear model linking speckle contrast with scatterers' decorrelation time. These limitations have so far prevented the use of the technique in clinical applications, as existing commercial devices are all based on the single-exposure S-LSCI approach. In this challenging context, we have evaluated two new instrumental and methodological approaches to overcome these challenges. Firstly, MESI data acquisition using synthetic exposure was implemented and compared to the modulated exposure classically used in MESI. *In vitro*, using microfluidic channels representative of microcirculation physiology, and *in vivo*, on a mouse model of obesity, we have shown that synthetic MESI acquisition makes it possible to assess relative flow variations, provided that the effect of instrumental noises on speckle contrast is properly assessed and corrected. The effect of various experimental biases (spatial undersampling and the effect of global movements) was also studied. Secondly, the use of neural networks was evaluated as an alternative to non-linear fitting for the extraction of blood flow maps in near-real time. A convolutional network (Res3D-Net) was trained and validated using a database of experimental speckle contrast images obtained *in vitro* using synthetic exposures for different flow rates and channel diameters. It demonstrated its ability to predict relative flow variations, with greater robustness and linearity than that obtained by fitting a non-linear model. The optimized MESI system was then used to study blood flow variations in the branch of the middle cerebral artery (MCA), irrigating the somatosensory cortex, imaged in response to whiskers stimulation in a mouse model of obesity. The study of obese mice shows the negative impact of obesity on the regulation of cerebral blood flow and suggests ways of correcting diet by balancing ω -3/ ω -6 polyunsaturated fatty acids ratio. Both instrumental and methodological avenues for improvement are discussed for blood flow quantification to lower the systematic underestimation of flow variations measured between the neural network and the model-fitting approach. The developments made to the MESI technique during this thesis pave the way for the study of relative blood flow changes at the microvascular level with an analysis time compatible with real-time clinical applications.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE I. CADRE DE LA THÈSE	2
1 L'obésité: prévalence et comorbidités associées	4
2 Objectifs de la thèse	6
3 Équipes de recherche impliquées	7
4 Productions scientifiques	9
CHAPITRE II. IMAGERIE DU DÉBIT SANGUIN CÉRÉBRAL	12
1 Enjeux de l'exploration de l'activité cérébrovasculaire par la mesure du débit sanguin	14
2 Techniques d'imagerie clinique pour l'étude de la macrocirculation sanguine	18
2.1 Imagerie par résonance magnétique	18
2.2 Tomographie par émission de positrons	20
2.3 Angiographie tomographique X	21
2.4 Imagerie ultrasonore	23
Conclusion sur les méthodes cliniques d'exploration du débit sanguin	25
3 Techniques d'imagerie préclinique pour l'étude de la microcirculation sanguine	25
3.1 Microscopie deux photons	25
3.2 Tomographie par cohérence optique	27
3.3 Imagerie photo-acoustique	29
3.4 Imagerie fonctionnelle ultrasonore ultrarapide	30
3.5 Imagerie laser Doppler	31
3.6 Imagerie du contraste laser speckle	32
3.7 Spectroscopie optique du contraste speckle	33
4 Comparaison des performances et limites des différentes modalités d'imagerie	34
Conclusion: Enjeux pour l'application de l'imagerie speckle multi-exposition en clinique	40
CHAPITRE III. DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME D'IMAGERIE SPECKLE SYNTHÉTIQUE À EXPOSITION MULTIPLE	42
Introduction	44
1 Bases théoriques et méthodologiques de l'imagerie speckle dynamique	45
1.1 Fondements théoriques de l'imagerie speckle dynamique	45
1.2 Imagerie speckle à exposition multiple	47
1.3 Variation des modèles d'autocorrélation en fonction du régime de diffusion	50
1.4 Choix de l'approche de calcul du contraste speckle	51
1.5 Choix du ou des temps d'exposition	54
1.6 Choix du grandissement optique et de l'ouverture numérique	56
1.6.1 Étude de l'influence de l'échantillonnage spatial des grains de speckle par le détecteur	56
1.6.2 Influence de la taille du filtre spatial	58
1.6.3 Effet de la profondeur de champ sur le contraste speckle	59
1.6.4 Évaluation expérimentale des paramètres optimaux de grandissement et d'ouverture numérique	61
2 MESI en exposition synthétique versus exposition modulée	62
2.1 Dispositif d'imagerie MESI en exposition modulée	63

2.2 Instrumentation pour l'acquisition MESI en exposition synthétique	65
2.3 Calcul du contraste speckle MESI pour les deux approches	65
2.4 Prises en compte des bruits en imagerie MESI modulée et synthétique	66
2.4.1 Expression du rapport signal sur bruit pour une caméra CMOS	67
2.4.2 Autres sources de bruit liés à l'architecture de la caméra	67
2.4.3 Importance relative des bruits en MESI pour les deux implémentations	69
3 Validation <i>in vitro</i> de l'approche MESI par exposition synthétique	72
3.1 Système microfluidique à débit et pression contrôlés	72
3.2 Caractérisation expérimentale des contributions des bruits au contraste speckle dans les deux approches MESI	74
3.3 Contribution relative du bruit de grenaille au contraste speckle en MESI synthétique selon les conditions d'imagerie	76
3.4 Effet de la durée inter-images sur l'évaluation du contraste speckle en exposition synthétique	79
3.5 Comparaison directe de la quantification relative du débit par expositions modulée et synthétique	80
4 Effet du mouvement sur l'évaluation du contraste speckle en exposition synthétique	81
4.1 Présentation du montage pour l'évaluation de l'effet des mouvements	82
4.2 Approche d'évaluation du biais lié aux mouvements latéraux	83
4.3 Etude du biais lié aux mouvements en z	85
Conclusion	87
CHAPITRE IV. IMPLÉMENTATION DE RÉSEAUX DE NEURONES POUR L'ANALYSE DES DONNÉES MESI	88
1 Les réseaux de neurones: une approche ancienne en pleine expansion	91
1.1 Du cerveau humain aux réseaux de neurones modèles	91
1.2 Architectures des réseaux de neurones pour l'apprentissage profond	93
1.3 Différentes approches d'apprentissage des réseaux de neurones	95
1.4 Apprentissage supervisé par rétropropagation des erreurs: principes d'implémentation	96
1.5 Les réseaux de neurones en imagerie biomédicale en 2023	98
1.6 État de l'art de l'application des réseaux de neurones en imagerie du contraste speckle dynamique	100
2 Architecture des réseaux convolutifs développés pendant la thèse	104
2.1 Réseau résiduel multicanaux: MSR-Net	107
2.2 Réseau résiduel tridimensionnel: Res3D-Net	107
2.3 Comment les architectures choisies permettent de gérer le problème de disparition du gradient ?	108
2.4 Choix de la fonction d'activation	108
3 Implémentation et entraînement supervisé des réseaux de neurones développés au cours de la thèse	109
3.1 Paramètres importants pour l'entraînement	109
3.2 La base de données d'entraînement	111
3.3 Génération des cartes cibles de débit	114
3.4 Génération des patches pour l'apprentissage et la validation	116
3.5 Implémentation et validation croisée des réseaux de neurones MSR-Net et Res3D-Net	117
3.6 Prédiction des cartes de débit à partir des réseaux entraînés	120
4 Performances des réseaux de neurones développés	121
4.1 Comparaison des performances des réseaux de neurones: MSR-Net <i>versus</i> Res3D-Net	121
4.2 Comparaison de l'approche par réseau de neurones à la méthode d'ajustement non-linéaire	123
Conclusion	127

CHAPITRE V. ÉTUDE DE LA VARIATION DU DÉBIT SANGUIN CÉRÉBRAL CHEZ LES SOURIS OBÈSES PAR MESI EN EXPOSITION SYNTHÉTIQUE	128
1 Physiopathologie de l'obésité	130
2 Systèmes vasculaires impliqués dans le couplage neurovasculaire	134
3 Systèmes cellulaires impliqués dans le couplage neurovasculaire	136
4 Description anatomofonctionnelle du cortex somatosensoriel en tonneaux	139
5 Protocole d'obtention du modèle animal de l'obésité	142
6 Validation de l'exposition synthétique <i>in vivo</i>	144
6.1 Préparation des animaux pour la chirurgie	144
6.2 Protocole d'acquisition	145
6.3 Protocole d'analyse des données	146
6.4 Comparaison de l'exposition synthétique à l'exposition modulée <i>in vivo</i>	146
7 Variation de la réponse hémodynamique induite par stimulation des vibrisses dans le cortex somatosensoriel en tonneaux des souris obèses comparées aux souris témoins	149
7.1 Protocole de stimulation du cortex somatosensoriel en tonneaux	149
7.2 Protocole d'analyse des données	150
7.3 Comparaison de la réponse hémodynamique entre les groupes de souris suite à la stimulation du cortex somatosensoriel en tonneaux	152
7.4 Effet de la supplémentation en DHA sur la réponse hémodynamique	154
Conclusion	157
CHAPITRE VI. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	158
1 Instrumentation et méthodologie du MESI en exposition synthétique	160
1.1 Contribution des bruits en fonction des conditions expérimentales	160
1.2 Défis liés à l'échantillonnage temporel	161
1.3 Recommandations pour l'imagerie MESI en exposition synthétique	162
2 Approche par réseau de neurones pour l'extraction du débit sanguin	163
2.1 Avantages des réseaux de neurones par rapport à l'ajustement non-linéaire	163
2.2 Atouts et limitations de l'emploi de données expérimentales pour l'entraînement des réseaux de neurones	166
3 Physiologie	168
3.1 Altération de la réponse hémodynamique chez les souris obèses	168
3.2 Approches possibles pour le rétablissement de l'hyperémie fonctionnelle	169
Au-delà de l'imagerie du débit sanguin cérébral	171
Bibliographie	172
Remerciements	190
Annexes	192
Tableau de conversion de débit en vitesse pour les canaux microfluidiques	
Article de validation du MESI en exposition synthétique <i>in vitro</i> publié dans « Scientific Reports »	
Article de validation des réseaux de neurones pour l'analyse des données MESI publié dans « Biomedical Optics Express »	

LISTE DES FIGURES

Figure I.1	Évolution de la prévalence de l'obésité en France entre 1997 et 2020 dans les différentes tranches d'âge.	4
Figure I.2	Répartition géographique des prévalences de l'obésité en 2020 dans les différentes régions françaises.	5
Figure I.3	Déroulé temporel de la thèse.	7
Figure II.1	Irrigation sanguine du cerveau.	15
Figure II.2	Représentation schématique de la synapse tripartite et de sa régulation métabolique.	16
Figure II.3	IRM fonctionnelle du cerveau chez l'humain.	20
Figure II.4	Cartes du débit sanguin cérébral chez un sujet normal (femme, 19 ans).	21
Figure II.5	Étude du débit sanguin cérébral par CT (avec agent de contraste exogène) pour la prise en charge d'un hématome sous-dural.	22
Figure II.6	Imagerie ultrasonore transcrânienne des vaisseaux cérébraux profonds chez l'homme.	24
Figure II.7	Le diabète augmente les perturbations de la vitesse des globules rouges dans les capillaires cérébraux en cas d'ischémie cérébrale.	27
Figure II.8	Comparaison des cartes de vitesse sanguine et de la vascularisation cérébrale évaluées par OCTA chez la souris.	28
Figure II.9	Imagerie photo-acoustique microscopique du cerveau de la souris.	30
Figure II.10	Imagerie fUS dans le cerveau du rat.	31
Figure II.11	Réponse hémodynamique suite la stimulation somatosensorielle de la patte et des vibrisses chez le rat.	33
Figure II.12	SCOS combine le principe de l'imagerie de speckle en surface et la spectroscopie DCS.	34
Figure II.13	Comparaison des modalités d'imagerie utilisées pour l'évaluation de la circulation sanguine quant à la résolution spatiale, la résolution temporelle, les paramètres hémodynamiques mesurables, le champ de vue et la profondeur de pénétration.	37
Figure III.1	La technique MESI permet une meilleure estimation de τ_c .	50
Figure III.2	Illustration des différentes approches de calcul du contraste speckle.	52
Figure III.3	Images <i>in vivo</i> du contraste speckle calculé par les différentes approches sur un nombre de pixels équivalent.	54
Figure III.4	Images du contraste speckle en imagerie MESI synthétique au niveau du cortex somatosensoriel de la souris pour différents temps d'exposition.	54
Figure III.5	Courbes théoriques du contraste speckle K, de la sensibilité absolue S_a et de la sensibilité relative S_r .	55
Figure III.6	Effets de l'ON et de G sur la taille d'un grain de speckle à 633 nm.	57
Figure III.7	Choix de l'ouverture numérique et du grandissement du système d'imagerie speckle en respect du critère de Shannon-Nyquist pour l'échantillonnage des grains de speckle par les pixels de la caméra.	58
Figure III.8	Effet de la taille du filtre spatial utilisé sur la mesure du contraste speckle.	59
Figure III.9	Mesure de la profondeur de champ.	60
Figure III.10	Variation de la profondeur de champ en fonction de G et de l'ON.	61
Figure III.11	Variation du contraste speckle en fonction de l'ON pour différents grandissements.	61
Figure III.12	Variation du contraste speckle en fonction du grandissement pour différentes ouvertures numériques.	62
Figure III.13	Imagerie MESI à exposition modulée.	64
Figure III.14	Montage de l'imagerie MESI à exposition synthétique.	65
Figure III.15	Approches d'acquisition MESI.	66

Figure III.16	Courbe typique bruit <i>versus</i> signal pour une caméra CMOS.	68
Figure III.17	Comparaison du FPN à $T = 20$ ms entre les caméras Thorlabs CS135MUN et la caméra Hamamatsu Orca-Flash 2.8.	70
Figure III.18	Homogénéité et stabilité des bruits d'obscurité et de lecture de la caméra Orca-Flash 2.8.	71
Figure III.19	Augmentation de la visibilité du FPN suite à l'augmentation du nombre d'images sommées.	72
Figure III.20	Puce microfluidique.	73
Figure III.21	Comparaison de la contribution des bruits en exposition modulée et en exposition synthétique pour un canal de $300 \mu\text{m}$ et un débit de $2 \mu\text{l}/\text{min}$.	74
Figure III.22	Contraste du au bruit de grenaille K_{shot} en fonction du temps d'exposition en exposition synthétique.	75
Figure III.23	Écarts-types du bruit de grenaille et du bruit d'obscurité en fonction du temps d'exposition en exposition synthétique.	76
Figure III.24	Effet du niveau d'illumination et du temps d'exposition sur la contribution du bruit de grenaille au contraste speckle en exposition synthétique.	77
Figure III.25	Erreur relative sur le calcul du contraste speckle due à la contribution des bruits en fonction du temps d'exposition pour différents débits d'intralipide-2% dans un canal de $300 \mu\text{m}$ de diamètre.	78
Figure III.26	Effet de la fréquence d'images et de la durée inter-images sur l'évaluation du contraste speckle K_{corr} en exposition synthétique.	79
Figure III.27	Images du contraste speckle d'une solution d'intralipide-2% pour différents débits et différents temps d'exposition dans un canal de $300 \mu\text{m}$ pour les deux approches d'acquisition.	80
Figure III.28	Comparaison entre le mode 1 (exposition modulée) et le mode 2 (exposition synthétique).	81
Figure III.29	Dispositif d'évaluation des artefacts de mouvement en MESI synthétique.	82
Figure III.30	Caractérisation des solutions « intralipide-glycérine ».	83
Figure III.31	Évaluation de l'effet du mouvement latéral sur le contraste speckle pour la solution d'intralipide-2% en mouvement brownien.	84
Figure III.32	Effet du mouvement latéral en fonction de la vitesse de déplacement, du temps d'exposition T , du temps de décorrélation τ_c et de la durée inter-images Δi .	85
Figure III.33	Effet de l'ouverture numérique et du grandissement et de l'ouverture numérique sur la mesure du contraste speckle.	86
Figure IV.1	Intelligence artificielle, apprentissage automatique et apprentissage profond.	90
Figure IV.2	Les neurones biologiques et artificiels.	92
Figure IV.3	Schéma représentatif de l'architecture des différents types de réseaux de neurones.	94
Figure IV.4	Réseau de neurones à une couche cachée.	96
Figure IV.5	Augmentation des publications en lien avec l'apprentissage automatique dans le domaine biomédical.	98
Figure IV.6	Vue d'ensemble d'un pipeline potentiel de modèles d'intelligence artificielle médicale.	100
Figure IV.7	Cartes de perfusion sanguine dérivées des données MESI.	101
Figure IV.8	Architecture du réseau convolutif « Multiple Stream Residual Neural Network » (MSR-Net).	105
Figure IV.9	Architecture du réseau convolutif « Residual 3-Dimensional Neural Network » (Res3D-Net).	106
Figure IV.10	Comparaison entre les fonctions d'activation « ReLU » et « Leaky ReLU ».	109
Figure IV.11	Les courbes d'entraînement et de validation.	110
Figure IV.12	Exemples d'images de contraste speckle de la base de données utilisée pour l'entraînement des réseaux de neurones.	112
Figure IV.13	Variation du contraste speckle en fonction du temps d'exposition.	113

Figure IV.14	Contraste speckle en fonction du temps d'exposition après normalisation par une estimation expérimentale de β calculée sur un grand champ de vision.	113
Figure IV.15	Génération des paires d'images « entrée-cible » pour l'entraînement du réseau de neurones.	115
Figure IV.16	Représentation de l'étape de génération des patches.	117
Figure IV.17	Schéma représentatif de la validation croisée à cinq niveaux.	118
Figure IV.18	Prédiction des cartes de débit.	120
Figure IV.19	Schéma récapitulatif des différentes étapes nécessaires pour entraîner le réseau de neurones puis prédire les cartes de débit.	121
Figure IV.20	Comparaison des cartes de débit prédites par le Res3D-Net et des cartes ICT dérivées de l'ajustement non-linéaire sous un grandissement de x2.5 et un grandissement de x6.	124
Figure IV.21	Variations relatives des débits et des ICT en fonction du débit réel dans des canaux microfluidiques de différents diamètres.	125
Figure IV.22	Le temps de calcul est estimé sur une image de 700 x 700 pixels en utilisant Python v3.9.	126
Figure V.1	Pourcentage de la population adulte qui serait obèse d'ici 2035.	131
Figure V.2	Schéma de l'IMC normal et de ses variations.	131
Figure V.3	Composition schématique de l'unité neurovasculaire au niveau de la barrière hémato-encéphalique.	134
Figure V.4	Représentation schématique du cercle de Willis et de ses principales branches.	135
Figure V.5	Hétérogénéité segmentaire des artères cérébrales et diversité des cellules vasculaires.	136
Figure V.6	Structure de l'unité neurovasculaire au niveau des différentes sections d'une artère cérébrale donnant naissance à une artériole.	139
Figure V.7	Voies synaptiques pour le traitement des informations sensorielles liées aux vibrisses dans le cortex somatosensoriel en tonneaux chez les rongeurs.	140
Figure V.8	Effet de la fréquence du stimulus sur la réponse hémodynamique mesurée par LSCI.	141
Figure V.9	Composition détaillée des régimes alimentaires utilisés dans les expériences de cette thèse.	143
Figure V.10	Comparaison du poids corporel entre les souris témoins et les souris obèses nourries par régime hyperlipidique pendant 12 semaines.	143
Figure V.11	Architecture du dispositif MESI.	146
Figure V.12	Comparaison du contraste speckle dans différents calibres de vaisseaux sanguins pour les deux approches du MESI.	147
Figure V.13	Comparaison des temps de décorrélation estimées par les deux approches du MESI.	148
Figure V.14	Schéma du protocole de stimulation des vibrisses.	150
Figure V.15	Diagramme résumant les étapes principales pour le calcul de la cinétique du paramètre Δ ICT et sa valeur maximale lors d'un essai de stimulation des vibrisses.	151
Figure V.16	Diagramme résumant les étapes principales de mise en forme et d'analyse de des données par le réseau Res3D-Net pour le calcul de ΔV maximale lors de la stimulation.	152
Figure V.17	Décours temporel de la réponse hémodynamique suite à la stimulation mécanique des vibrisses sur un même essai.	153
Figure V.18	Comparaison de la réponse hémodynamique de la MCA entre les souris obèses et les souris contrôles.	154
Figure V.19	Comparaison du poids corporel, des masses grasse et maigre et de la glycémie à jeun entre les trois groupes de souris (souris régimes standard, HFD-1 et HFD-2).	155
Figure V.20	Comparaison de la réponse hémodynamique entre les souris sous régime standard, les souris obèses sous régime HFD-1 et les souris obèses sous régime HFD-2 (DHA).	156
Figure VI.1	Développements de fantômes à propriétés d'absorption et de diffusion variables pour simuler le tissu biologique.	167

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1	Équipes de recherches impliquées dans la thèse.	8
Tableau II.1	Comparaison des paramètres physiologiques dans les différents types de vaisseaux sanguins cérébraux entre l'homme et la souris.	17
Tableau II.2	Tableau récapitulatif des techniques d'imagerie utilisées pour la mesure du débit sanguin avec les mécanismes de contraste et les paramètres physiologiques mesurables associés.	36
Tableau II.3	Tableau récapitulatif des études cliniques en imagerie speckle pour l'évaluation du débit sanguin cérébral.	39
Tableau III.1	Tableau résumant les différents régimes de diffusion dans différents calibres de vaisseaux sanguin et les fonctions d'autocorrélation du champ $g_1(\tau)$ associées.	51
Tableau IV.1	Tableau comparatif des approches par réseaux de neurones adoptées par différentes études pour l'analyse des données speckle.	103
Tableau IV.2	Tableau récapitulatif des données d'entraînement et des deux architectures de réseaux de neurones implémentées pour l'analyse des données speckle MESI.	114
Tableau IV.3	Récapitulatif du nombre de patches utilisés pour les différentes approches de validation.	119
Tableau IV.4	Comparaison des mesures de performance pour les différents réseaux implémentés.	122
Tableau V.1	Nombre de souris et d'essais retenus.	152

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACA Artère Cérébrale Antérieure	MESI Multiple Exposure Speckle Imaging
ADAM Adaptive Moment Estimation	IRM Imagerie par Résonance Magnétique
AGPI Acides Gras Poly-Insaturés	MSR-Net Multiple Stream Residual Neural Network
ANN Artificial Neural Network	NdG Niveau de gris
AOM Acousto-Optic Modulator	NO Oxyde Nitrique
ASL Arterial Spin Labeling	OCT Optical Coherence Tomography
ATP Adénosine triphosphate	OCTA OCT Angiographique
AVC Accident Vasculaire Cérébral	ON Ouverture Numérique
AWG Arbitrary Waveform Generator	PDMS Polydiméthylsiloxane
BHE Barrière Hémato-Encéphalique	PRNU Photon Response Non Uniformity
BN Batch Normalization	TEP Tomographie par Émission de Positrons
BOLD Blood Oxygen Level Dependent	Res3D-Net Residual 3-Dimensional Neural Network
CBF Cerebral Blood Flow	RMSProp Root Mean Square Propagation
CNN Convolutional Neural Network	ROI Region Of Interest
COX Cyclooxygénase	RSBM Rapport Signal sur Bruit Maximal
CT Computed Tomography	SCOS Speckle Contrast Optical Spectroscopy
DCS Diffuse Correlation Spectroscopy	SGD Stochastic Gradient Descent
DHA Acide Docosahexaénoïque	S-LSCI LSCI à simple exposition
DIO Diet Induced Obesity	SNR Signal to Noise Ratio
DLS Dynamic Light Scattering	S_{o2} Saturation en oxygène
DSNU Dark Signal Non Uniformity	SPAD Single-Photon Avalanche Diode
DT2 Diabète de type 2	T1 Temps de relaxation longitudinale
EAM Erreur Absolue Moyenne	T2 Temps de relaxation transversale
EQ Efficacité Quantique	TPLSM Two Photon Laser Scanning Microscopy
EQM Erreur Quadratique Moyenne	US Ultrasons
ES Erreur Standard	WD Western Diet
FCM Fuzzy C-Means	
FDG Fluorodésoxyglucose	
FPGA Field Programmable Gates Array	
FPN Fixed Pattern Noise	
fTCD Functional Transcranial Doppler Imaging	
FULM Functional Ultrasound Localization Microscopy	
fUS Imagerie ultrasonore fonctionnelle ultrarapide	
G Grandissement optique	
GABA Acide gamma-aminobutyrique	
GAN Generative Adversarial Network	
GIP Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide	
GLP-1 Glucagon-Like Peptide-1	
HFD High Fat Diet	
IA Intelligence Artificielle	
ICT Inverse Correlation Time	
IMC Indice de Masse Corporelle	
ISS Indice de Similarité Structurale	
LDF Laser Doppler Flowmetry	
LSCI Laser Speckle Contrast Imaging	
MCA Median Cerebral Artery	

CHAPITRE I. CADRE DE LA THÈSE

1 L'obésité: prévalence et comorbidités associées	4
2 Objectifs de la thèse	6
3 Équipes de recherche impliquées	7
4 Productions scientifiques	9

1 L'OBÉSITÉ: PRÉVALENCE ET COMORBIDITÉS ASSOCIÉES

L'obésité constitue l'une des principales préoccupations de santé publique mondiale. La prévalence de l'obésité ne cesse d'augmenter partout dans le monde, y compris dans les pays en voie de développement. Selon l'organisation mondiale de la santé, le nombre de cas d'obésité a presque triplé mondialement depuis 1975 (www.who.int). L'obésité est associée à de nombreuses maladies chroniques telles que les maladies cérébrovasculaires, les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2 (DT2) et de nombreux cancers (l'adénocarcinome rénal, l'hépatocarcinome, le cancer colorectal, le cancer du sein, et le cancer de la prostate parmi d'autres) (Goossens, 2017a). L'impact de l'obésité sur la santé publique et son coût économique et social sont donc considérables, en France et au niveau mondial. Le développement de l'obésité varie avec plusieurs facteurs tels que l'âge (Figure I.1), la localisation sur le territoire (Figure I.2) et la génétique des populations. En outre, ce problème de santé est dépendant de la classe sociale et il est plus répandu dans les classes sociales modestes. Afin d'évaluer l'impact de ces différents facteurs sur le développement de l'obésité, l'institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) et la société Roche conduisent une série d'enquêtes épidémiologiques « Obépi-Roche » sur l'obésité chez les adultes en France effectuées à intervalle régulier d'environ 5 ans. La dernière étude, datant de 2020, a montré que 47.3 % des Français souffraient d'un excès de poids, dont 17 % sont en situation d'obésité. La prévalence de l'obésité pour les différentes tranches d'âge a doublé entre 1997 et 2020. Cette augmentation est encore plus marquée chez les plus jeunes, ce qui constitue une tendance très inquiétante.

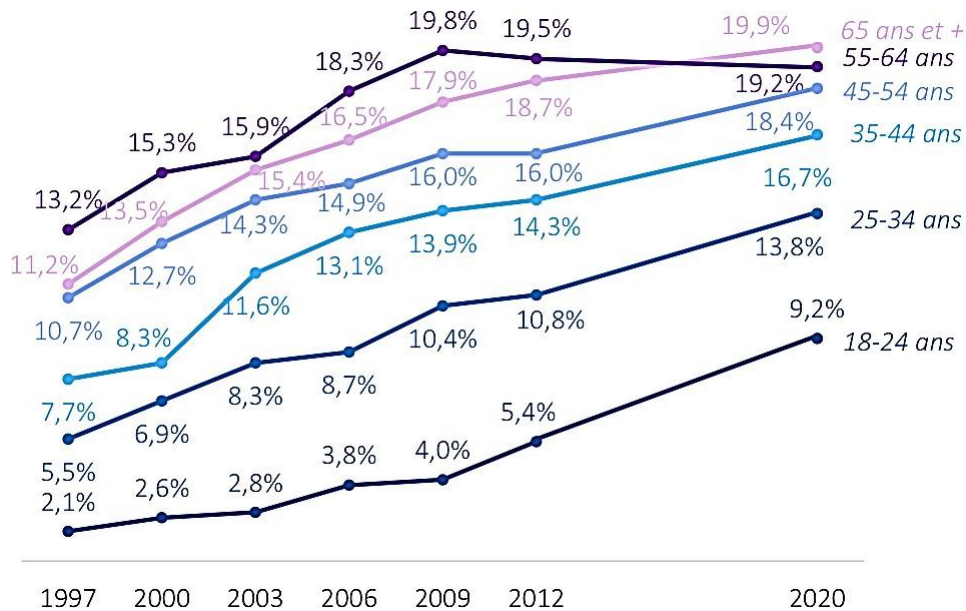


Figure I.1. Évolution de la prévalence de l'obésité en France entre 1997 et 2020 dans les différentes tranches d'âge (enquête Obépi-Roche 2020).

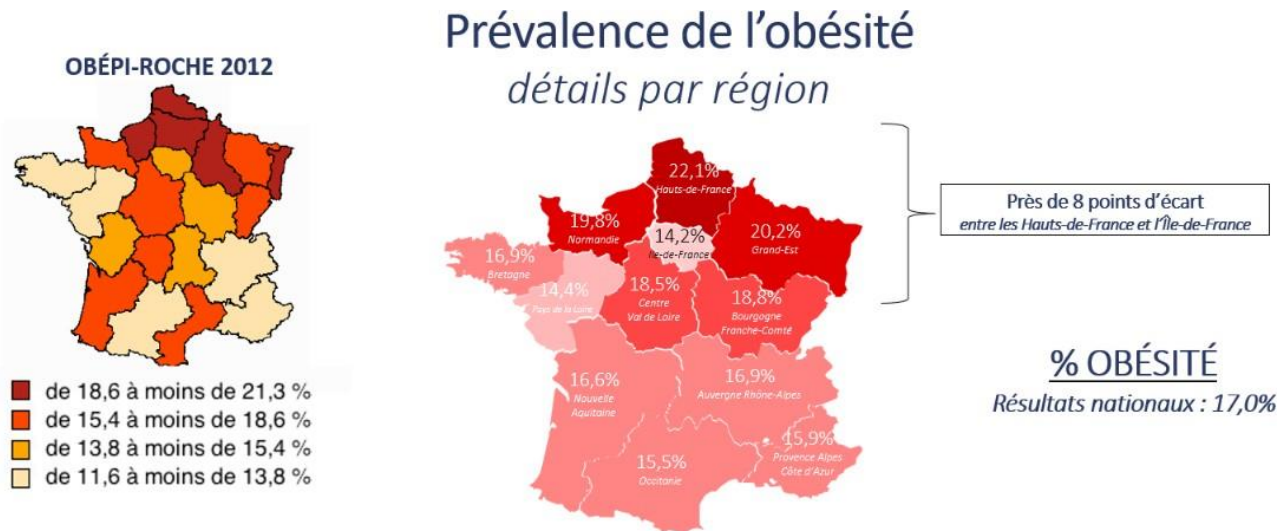


Figure I.2. Répartition géographique des prévalences de l'obésité en 2020 dans les différentes régions françaises (enquête « Obépi-Roche » 2020).

Le cerveau fait partie de l'une des structures les plus fragilisées par l'obésité. Une augmentation très rapide de l'inflammation vasculaire et neuronale, suivie d'une résistance à l'insuline et des problèmes cérébrovasculaires sont décrits au début de la maladie (Greenberg et al., 2006a; Anstey et al., 2011). De ce fait, l'obésité est un facteur facilitateur et/ou aggravant du développement de maladies neurodégénératives comme la démence vasculaire (pour revue sur les comorbidités liés à l'obésité, Anstey et al., 2011) et la maladie d'Alzheimer (Gustafson et al., 2003). Effectivement, les personnes prédisposées à développer une maladie neurodégénérative montrent généralement des perturbations métaboliques cérébrales (Blass et al., 2000). L'hypométabolisme cérébral visualisé en PET-FDG (tomographie par émission de positrons au fluorodésoxyglucose) fait partie des marqueurs cliniques de la maladie d'Alzheimer (Mosconi, 2005). Les besoins énergétiques du cerveau sont remarquables à la fois par leur intensité et par leur dynamique. Environ 20 % de l'oxygène et 25 % du glucose consommés par le corps humain sont consacrés aux fonctions cérébrales (pour revue sur le métabolisme énergétique du cerveau, Bélanger et al., 2011). Étant donné que le cerveau ne possède pas de réserves énergétiques, le métabolisme physiologique cérébral est assuré par un débit sanguin dynamique qui s'adapte aux besoins énergétiques globaux et locaux. Il existe de nombreuses techniques d'imagerie utilisées en clinique pour l'évaluation du débit sanguin cérébral (CBF pour « Cerebral Blood Flow »). Néanmoins, pour mieux comprendre les altérations des mécanismes de régulation à l'échelle de la microcirculation dans le cerveau chez les personnes obèses, l'étude de modèles animaux adaptés reste la stratégie scientifique la plus adéquate.

2 OBJECTIFS DE LA THÈSE

La fragilité vasculaire, une des premières conséquences de l'obésité, peut entraîner des complications graves tels que les accidents vasculaires cérébraux (AVC), une des principales causes de mortalité chez les patients obèses. La régulation du débit sanguin est un des paramètres les plus pertinents pour évaluer cette fragilité cérébrovasculaire. L'imagerie de contraste speckle (LSCI) est une technique d'imagerie qui a permis sur les modèles animaux l'obtention des cartes de débit sanguin de haute résolution spatiale et temporelle, compatible avec l'étude de la régulation du débit sanguin dans des vaisseaux de l'ordre de la dizaine de micromètres. L'approche multi-exposition (MESI), développée initialement dans le groupe d'A.K. Dunn à l'Université du Texas, USA, a été implémentée dans notre groupe durant la thèse de H. Soleimanzad (2015-2018). C'est une amélioration substantielle de la technique LSCI qui permet une meilleure quantification des débits, en particulier en présence de diffuseurs statiques, ce qui est systématiquement le cas en conditions réelles pour des tissus biologiques. Cependant, la méthode MESI traditionnelle se caractérise par une instrumentation relativement complexe et nécessite l'extraction des cartes de débit sanguin par l'ajustement d'un modèle non-linéaire multiparamétrique, pixel par pixel, qui est coûteuse en temps de calcul. Pour ces raisons, bien qu'utilisée dans les études précliniques, la technique MESI reste jusqu'à ce jour incompatible avec les applications médicales et les seules implémentations cliniques de la mesure du débit par imagerie speckle reposent sur l'approche en simple exposition (S-LSCI).

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse interdisciplinaire sont doubles. Il s'agit d'une part de réaliser, caractériser et valider *in vitro* puis *in vivo* des développements instrumentaux et méthodologiques originaux qui constituent une étape indispensable pour envisager la simplification de l'instrumentation du système d'imagerie MESI et sa potentielle application en imagerie clinique. D'autre part, des données d'imagerie du débit sanguin cérébral ont été obtenues par la technique MESI sur des groupes de souris témoins et modèles de l'obésité, tant au repos que lors de stimulation somatosensorielle. Au-delà de permettre la validation *in vivo* de l'instrumentation et des méthodologies développées au cours de la thèse, ces études ont permis de produire des résultats biologiques préliminaires originaux quant à l'effet de l'obésité sur le couplage neurovasculaire.

Après l'introduction du contexte de la thèse (Chapitre I) et des techniques d'imagerie du débit sanguin cérébral (Chapitre II), nous présenterons l'implémentation et la validation *in vitro* de la technique d'exposition synthétique comme alternative à l'exposition modulée (technique instrumentale traditionnelle pour l'imagerie MESI), avec les différentes optimisations apportées au système d'imagerie (Chapitre III). Nous détaillerons ensuite l'implémentation de deux architectures de réseaux de neurones convolutionnels comme alternative au modèle d'ajustement non-linéaire pour l'extraction des cartes de débit sanguin (Chapitre IV). Enfin, nous aborderons l'étude de la variation du débit sanguin dans la branche de l'artère cérébrale moyenne (MCA pour

« Middle Cerebral Artery ») qui irrigue le cortex somatosensoriel dans un modèle murin de l'obésité (Chapitre V) en nous basant sur le système d'imagerie MESI optimisé.

Pour l'étude de la variation du débit sanguin cérébral, nous avons utilisé l'activation somatosensorielle par la stimulation mécanique des vibrisses de la souris. Cette stimulation induit une activation du cortex somatosensoriel en tonneaux qui peut être évaluée par la mesure de la variation du débit sanguin de la branche de la MCA. Cette technique a été appliquée chez des souris obèses (sous régime riche en gras ou « high fat ») qui ont été comparées à des souris témoins de même âge (souris sous régime alimentaire standard). La comparaison de la variation du débit sanguin de la MCA entre les différents groupes, nous a permis de montrer la présence d'une diminution du débit en réponse à une stimulation physiologique chez les souris obèses. L'effet de la supplémentation en acides gras polyinsaturés (AGPI) protecteurs ω -3 pour équilibrer le rapport ω -3/ ω -6 des AGPI a également été testé. Ceci a montré une amélioration de l'hyperémie fonctionnelle chez les souris obèses.

La Figure I.3 illustre la planification temporelle et la progression des différentes étapes de la thèse, offrant ainsi une vision globale du déroulement en vue de l'atteinte des objectifs.

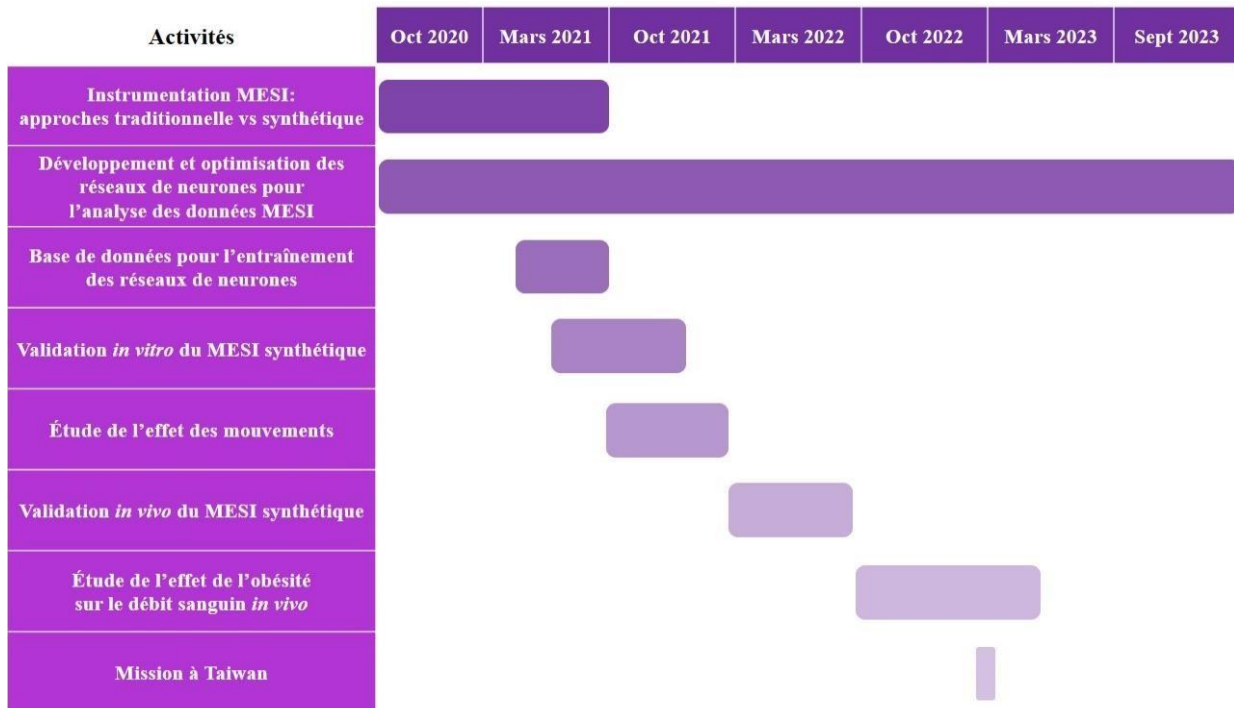


Figure I.3. Déroulé temporel de la thèse.

3 ÉQUIPES DE RECHERCHE IMPLIQUÉES

Cette thèse interdisciplinaire est l'aboutissement d'un travail collaboratif entre chercheurs et ingénieurs de trois laboratoires différents: le laboratoire Charles Fabry (LCF) de l'Université Paris-Saclay, le laboratoire de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA) de l'Université Paris-Cité et

le laboratoire d’Imagerie Médicale et de Sciences Radiologiques (« Department of Medical Imaging and Radiological Sciences ») de l’Université Chang Gung à Taiwan.

Au sein du LCF, avec mon co-directeur de thèse en Physique Frédéric Pain, nous avons monté, caractérisé et validé *in vitro* les deux systèmes d’imagerie de contraste speckle MESI sur des fantômes microfluidiques. Ensuite, nous avons installé le système d’imagerie au laboratoire BFA au sein de l’équipe REGLYS spécialisée dans l’étude du diabète et de l’obésité. Au laboratoire BFA, avec mon co-directeur de thèse en Neurophysiologie Hirc Gurden, nous avons validé d’abord la technique MESI à exposition synthétique *in vivo* en la comparant à la technique MESI à exposition modulée. Puis, nous avons effectué ensemble les expériences sur le modèle murin de l’obésité pour l’étude de l’impact de l’obésité sur la régulation du débit sanguin cérébral.

En parallèle à ces travaux, et dans le cadre d’une collaboration internationale franco-taiwanaise (programme Hubert Curien, ORCHID, projet « Machine Learning for Multiple Exposure Speckle Imaging », ML-MESI) portée par Frédéric Pain, nous avons développé et optimisé, avec le Dr. Hsin-Hon Lin et le doctorant Chao-Yueh Yu, des réseaux de neurones pour l’extraction des cartes de débit sanguin comme alternative à la méthode d’ajustement non-linéaire. Une fois le réseau de neurones optimisé, nous l’avons implémenté au LCF avec le soutien de Mondher Besbes (ingénieur de recherche au LCF).

Finalement, le développement et la caractérisation du système d’imagerie multispectrale n’aurait pas été possible sans les discussions fructueuses et l’aide des services instrumentation et de mécanique du LCF, en particulier Christophe Hecquet, Noam Atlas et Jean-René Rullier. Leur aide a été précieuse pour la conception des pièces optomécaniques du système MESI et la réalisation d’un moule utilisé pour une approche simplifiée de fabrication de fantômes microfluidiques complexes.

		<u>Nom</u>	<u>Rôle</u>
Université Paris-Saclay (France)	<i>Laboratoire Charles Fabry</i>	Frédéric Pain	Co-directeur de thèse
		Patrick Georges	Directeur du laboratoire
		Christophe Hecquet	Ingénieur de recherche
		Mondher Besbes	Ingénieur de recherche
		Noam Atlas	Ingénieur d’études en mécanique
		Jean-René Rullier	Technicien mécanicien
		Flora Silberzian	Stagiaire
Université Paris-Cité (France)	<i>Laboratoire de Biologie Fonctionnelle et Adaptative</i>	Hirc Gurden	Co-directeur de thèse
		Christophe Magnan	Directeur de l’équipe
Université Chang Gung (Taiwan)	<i>Laboratoire d’imagerie médicale et de sciences radiologiques</i>	Hsin-Hon Lin	Docteur chercheur
		Chao-Yueh Yu	Doctorant

Tableau I.1. Équipes de recherches impliquées dans la thèse.

4 PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

ARTICLES SCIENTIFIQUES

Yu C.Y., Chammas M., Gurden H., Lin H.H., et Pain F. "Design and validation of a convolutional neural network for fast, model-free blood flow imaging with multiple-exposure speckle imaging.", *Biomedical Optics Express* (2023), 14(9), 4439-4454. (Yu, Chammas et al., 2023) (DOI: 10.1364/BOE.492739)

Chammas M., and Pain F. "Synthetic exposure with a CMOS camera for multiple exposure speckle imaging of blood flow." *Scientific Reports* 12.1 (2022): 1-11. (Chammas and Pain, 2022) (DOI: 10.1038/s41598-022-08647-6)

DONNÉES DE RECHERCHE PUBLIÉES EN ACCÈS LIBRE

Base de données expérimentale de contraste speckle acquise dans des conditions bien contrôlées de débit, d'exposition et de dimension représentative de la physiologie du débit sanguin (Entrepôt Recherche Data Gouv, DOI: 10.57745/KHGHTO).

ACTES DE CONFÉRENCE

Chammas M., Yu C.H., Lin H.H., and Pain F. "Unwanted movement bias evaluation for multiple exposure speckle imaging of blood flow using the synthetic exposure approach.", *European Conference on Tissue Optics and Photonics II, SPIE ECBO Photonics Europe Congress, Optical Society of America*, Strasbourg 2022. (Chammas et al., 2022) (DOI: 10.1117/12.2620674)

Chammas M., Yu C.H., Gurden H., Lin H.H., and Pain F. "Comparison of synthetic exposure and sequential exposure for multiple exposure speckle imaging of blood flow." *European Conference on Biomedical Optics, Diffuse Optical Spectroscopy and Imaging VIII, SPIE ECBO Photonics Europe Congress, Optical Society of America*, Munich 2021. (Chammas et al., 2021) (ISBN: 978-1-943580-95-8)

COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

Chammas M., Yu C.H., Gurden H., Lin H.H., et Pain F. "Evaluation of Convolutional Neural Networks as an Alternative for the Non-Linear Fitting for Multiple Exposure Speckle Imaging of Blood Flow.", *European Conference on Biomedical Optics, Optical Society of America*, Munich 2023. Présentation orale

Chammas M., Yu C.H., Lin H.H., et Pain F. "Unwanted movement bias evaluation for multiple exposure speckle imaging of blood flow using the synthetic exposure approach.", *Tissue Optics and Photonics, SPIE Photonics Europe Congress*, Strasbourg (2022). Présentation orale

Yu CY., Chammas M., Lin H.H., et Pain F. "Blood flow mapping using machine learning analysis of multiple exposure speckle imaging data.", *Clinical Biophotonics, SPIE Photonics Europe Congress*, Strasbourg (2022). Présentation orale

Chammas M., Yu C.H., Gurden H., Lin H.H., et Pain F. "Comparison of synthetic exposure and sequential exposure for multiple exposure speckle imaging of blood flow." *European Conference on Biomedical Optics. Optical Society of America*, 2021. E-Poster

COMMUNICATION NATIONALE

Chammas M., Gurden H., et Pain F., "Développements de l'imagerie de contraste speckle multi-exposition pour l'étude de la microcirculation sanguine." *Journée Annuelle de la Société Cerveau et Maladies Cerebrovasculaires (SCMC)*, Paris, Juin 2022. Présentation orale

SÉMINAIRES

Chammas M., "Speckle imaging concept and practical implementation", Université Chang Gung, Taiwan, Novembre 2022.

Chammas M., "Développements de l'imagerie de contraste speckle pour l'étude de la microcirculation sanguine en temps réel", Séminaire du Laboratoire Charles Fabry, Palaiseau, Mai 2021.

CHAPITRE II. IMAGERIE DU DÉBIT SANGUIN CÉRÉBRAL

1	Enjeux de l'exploration de l'activité cérébrovasculaire par la mesure du débit sanguin	14
2	Techniques d'imagerie clinique pour l'étude de la macrocirculation sanguine	18
2.1	Imagerie par résonance magnétique	18
2.2	Tomographie par émission de positrons	20
2.3	Angiographie tomographique X	21
2.4	Imagerie ultrasonore	23
	Conclusion sur les méthodes cliniques d'exploration du débit sanguin	25
3	Techniques d'imagerie préclinique pour l'étude de la microcirculation sanguine	25
3.1	Microscopie deux photons	25
3.2	Tomographie par cohérence optique	27
3.3	Imagerie photo-acoustique	29
3.4	Imagerie fonctionnelle ultrasonore ultrarapide	30
3.5	Imagerie laser Doppler	31
3.6	Imagerie du contraste laser speckle	32
3.7	Spectroscopie optique du contraste speckle	33
4	Comparaison des performances et limites des différentes modalités d'imagerie	34
	Conclusion: Enjeux pour l'application de l'imagerie speckle multi-exposition en clinique	40

La mesure de la circulation sanguine présente plusieurs intérêts en clinique. Elle joue en effet un rôle crucial dans la perfusion des tissus et peut aider à diagnostiquer et à évaluer les troubles tels que l'ischémie et l'hypoperfusion, qui sont les symptômes ou les conséquences de pathologies. Par exemple, au niveau de la microcirculation sanguine, des altérations précoces peuvent être des signes précurseurs de diverses pathologies, y compris les maladies cardiovasculaires, les troubles métaboliques, les maladies inflammatoires et les cancers. L'évaluation de la microcirculation donne indirectement des informations sur l'angiogenèse, la vasodilatation et la vasoconstriction tout comme sur les processus d'inflammation (Den Uil et al., 2008; Kusza et al., 2011).

Nous présenterons dans une première partie de ce chapitre les principales modalités d'imagerie cliniques qui fournissent des informations sur la circulation sanguine. Nous avons choisi de présenter des applications essentiellement en imagerie cérébrale avec ses contraintes propres car c'est sur cet organe cible, très dense en vaisseaux sanguins de petits calibres, que nous avons validé sur un modèle murin les développements instrumentaux réalisés au cours de la thèse (cf. Chapitre V). Après avoir discuté les avantages et limites des différentes techniques, nous présenterons dans une seconde partie, les techniques de hautes résolutions spatiotemporelles et sensibilité employées en recherche préclinique. Nous concluons en montrant l'intérêt de lever les verrous technologiques et méthodologiques pour l'emploi clinique de l'imagerie du contraste speckle.

1 ENJEUX DE L'EXPLORATION DE L'ACTIVITÉ CÉRÉBROVASCULAIRE GRÂCE À LA MESURE DU DÉBIT SANGUIN

Le cerveau humain a été longtemps comparé aux superordinateurs dans une approche mécanistique. Néanmoins, cette comparaison réductionniste peine à appréhender la complexité extrême et encore largement méconnue du fonctionnement non séquentiel et distribué de cet organe (Carey et al., 1990). Une des raisons de cette complexité réside également dans le traitement énergétique et métabolique local de l'imposante charge informationnelle que les réseaux neuronaux doivent traiter. En effet, le cerveau adulte correspond environ à 2 % du poids corporel total mais sa consommation énergétique représente environ 20 % de l'énergie totale utilisée par le corps. Le taux élevé du métabolisme cérébral reste remarquablement constant malgré la variabilité des activités mentales et motrices (Raichle et al., 2002).

Dans le cerveau des mammifères, la circulation sanguine cérébrale est assurée par le cercle de Willis, réseaux d'artères cérébrales (Figure II.1) situé à la base du cerveau et qui possède souvent une forme de polygone. Le sang oxygéné est pompé par le cœur et arrive au cercle de Willis par l'intermédiaire des artères carotides et des artères vertébrales. Ensuite, le sang riche en nutriments, tels que l'oxygène et le glucose, irrigue, suivant des mécanismes actifs, les différentes zones du cerveau selon les besoins énergétiques. Une fois que les échanges sont achevés, les veines ramènent le sang désoxygéné au cœur pour éliminer les déchets tels que le dioxyde de carbone, l'acide lactique et divers métabolites dont ceux du cholestérol.

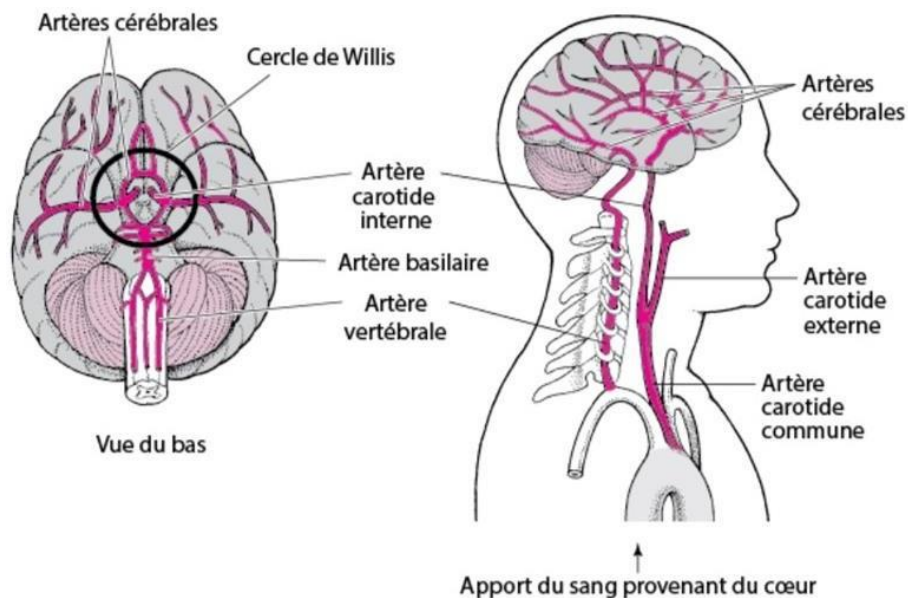


Figure II.1. Irrigation sanguine du cerveau chez l'humain.

Contrairement aux autres organes, le cerveau ne dispose pas de réservoirs énergétiques, comme le glucose stocké sous forme de glycogène dans le foie et les muscles. Pour répondre aux besoins énergétiques du cerveau, des nutriments tels que le glucose et l'oxygène doivent parvenir au cerveau au moyen d'un flux continu de la circulation sanguine. Les mécanismes de la consommation énergétique cérébrale sont étudiés depuis une trentaine d'années mais la répartition du budget énergétique très complexe entre les différents processus fonctionnels aérobie et anaérobie est encore débattue. Le développement des techniques d'imagerie cérébrales cliniques destinées à l'exploration du cerveau humain a conduit depuis les années 1990 à étudier et proposer des mécanismes du couplage neurovasculaire (cf. Chapitre V) et neuro-énergétique. En effet, ces différentes techniques d'imagerie neurofonctionnelle utilisées tant en recherche qu'en clinique sont basées sur la mesure directe ou indirecte de paramètres physiologiques liés au métabolisme énergétique et à la circulation sanguine. Il est donc apparu essentiel de comprendre le lien entre les signaux d'imagerie et les mécanismes physiologiques sous-jacents, en particulier le couplage entre l'activité cellulaire et les paramètres hémodynamiques. Une avancée majeure a été obtenue avec le modèle de la synapse tripartite pour décrire le couplage neuro-énergétique (Figure II.2) (Pellerin et al., 1994, 1998). Ce modèle décrit le couplage entre neurones, astrocytes et vaisseaux sanguins pour expliquer le mécanisme de l'apport de substrat énergétique en réponse à une activation cellulaire locale. Le glucose est pompé par l'astrocyte dans la circulation sanguine puis, après métabolisation en lactate, celui-ci est transféré depuis l'astrocyte vers le neurone pour répondre à une demande énergétique accrue lors de l'activation du neurone.

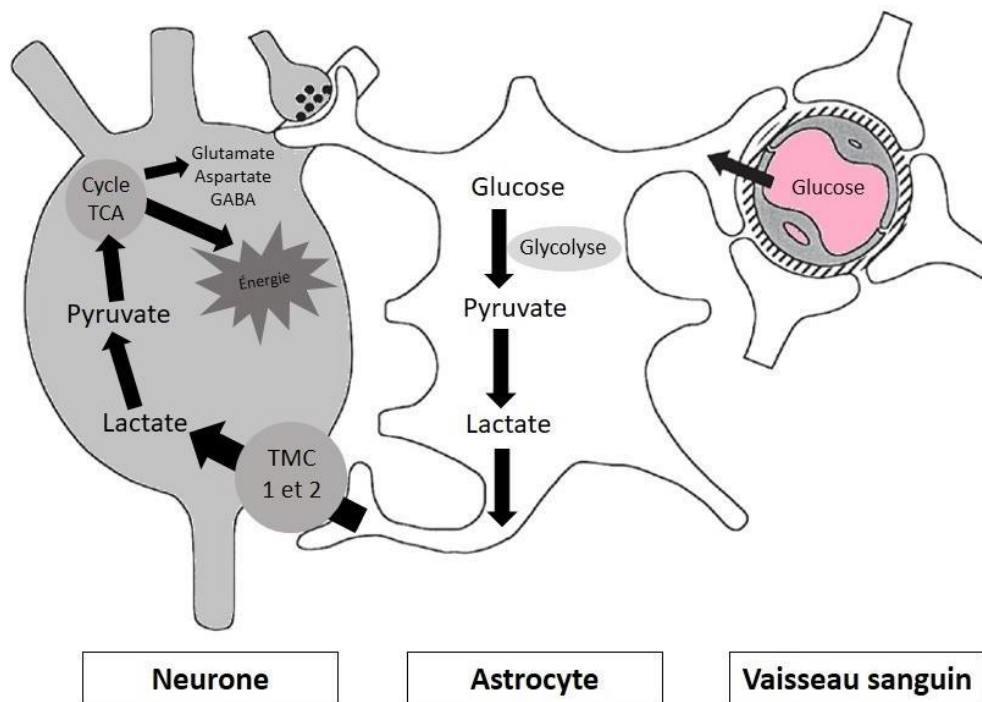


Figure II.2. Représentation schématique de la synapse tripartite et de sa régulation métabolique. Après l'activation neuronale et la libération synaptique de glutamate, la recapture du glutamate dans les astrocytes favorise l'entrée du glucose dans les capillaires. Le glucose est ensuite transformé par glycolyse en lactate par les astrocytes. L'échange de lactate entre les astrocytes et les neurones est assuré par des transporteurs de monocarboxylate (TMC). Le lactate est ensuite converti en pyruvate dans les neurones. Le pyruvate entre dans le cycle TCA (cycle de l'acide citrique), générant ainsi de l'ATP (adénosine triphosphate). Certains des carbones de la molécule de lactate entrent dans des pools d'acides aminés tels que les neurotransmetteurs glutamate, aspartate et GABA (acide gamma-aminobutyrique). (Adaptée de Pellerin et al., 1998)

Pendant longtemps, le réseau neuronal et le réseau vasculaire ont été considérés comme complètement indépendants. Néanmoins, durant les deux dernières décennies, la dynamique du débit sanguin cérébral a été attribuée au couplage neurovasculaire dans le cerveau (pour revue sur le couplage neurovasculaire, Phillips et al., 2016). À la suite d'une activation neuronale, plusieurs paramètres hémodynamiques varient localement, notamment le débit et le volume sanguin, l'oxygénation du sang et le diamètre des vaisseaux. Ces paramètres définissent la réponse hémodynamique. Celle-ci dépend de plusieurs facteurs, entre autres, l'amplitude de l'activation neuronale, la zone d'activation et le type de vaisseaux impliqués. Le Tableau II.1 résume pour l'humain et la souris, les différences anatomiques et fonctionnelles entre les artères, les veines et les capillaires à l'état basal. Cet état basal déterminera également la réponse neurovasculaire à l'activation.

	Humain	Souris	
Diamètre (μm) b, c, d	Artériole	Artères piales: jusqu'à 5000 Artéριοles descendantes: 35	Artères piales: jusqu'à 100 Artéριοles descendantes: 10
	Capillaire	< 10	4 à 10
	Veinule	Veines superficielles: jusqu'à 6000 Veines ascendantes: 65	10 à 90
Vitesse (mm/s) b, c, d	Artériole	150	3 à 15
	Capillaire	< 10	0.5 à 3
	Veinule	100	2 à 5
Pression sanguine (mm Hg)^a	Artériole	40	N.D
	Capillaire	25	
	Veinule	20	
P_{O₂} (mm Hg)^a	Artériole	60 à 110	N.D
	Capillaire	20 à 60	
	Veinule	30 à 60	
Volume sanguin total (ml)		≈ 5000	≈ 2

Tableau II.1. Comparaison des paramètres physiologiques dans les différents types de vaisseaux sanguins cérébraux entre l'homme et la souris. (N.D: Non Disponible) ((a) Cardim et al., 2019; (b) Chaigneau et al., 2003; (c) Nantapat et al., 2011; (d) Richards et al., 2013)

L'évaluation indirecte de l'activation cérébrale par la mesure de l'activité hémodynamique reste une approche complexe car une augmentation locale de la consommation énergétique et du débit sanguin ne traduisent pas nécessairement une activation mais peuvent être le reflet d'une inhibition locale de l'activité électrique (Lauritzen, 2001). De plus, les paramètres physiologiques varient dans l'arborescence vasculaire tant à l'échelle spatiale que temporelle (Sherwin et al., 2003; Cardim et al., 2019).

Le couplage neurovasculaire est à la base de la régulation du débit sanguin au niveau des vaisseaux sanguins cérébraux à la suite d'une activation neuronale. Une altération du couplage neurovasculaire physiologique entraîne un déséquilibre des entrées et des sorties vasculaires, ce qui peut avoir des conséquences délétères sur l'activité cérébrale (W. Li et al., 2013; Phillips et al., 2016). Le dérèglement du couplage neurovasculaire a déjà été observé en cas d'obésité (W. Li et al., 2013), d'hyperglycémie aiguë (Dorner et al., 2003) et de diabète (Kelly-Cobbs et al., 2012; Duarte et al., 2015).

Dans cette thèse, nous avons travaillé sur un modèle animal murin de l'obésité pour étudier l'activation neurovasculaire au niveau du cortex somatosensoriel en tonneaux. Ce modèle est l'un des modèles les plus utilisés et est particulièrement bien connu pour explorer la variation des paramètres hémodynamiques cérébraux lors d'une stimulation sensorielle physiologique (Giaume et al., 2009; Wu et al., 2011). Dans la suite de ce chapitre, nous présenterons les différentes

techniques d'imagerie fonctionnelle en nous concentrant volontairement sur celles permettant la mesure du débit sanguin cérébral local. Nous avons choisi de présenter les techniques d'imagerie fonctionnelle en deux grandes catégories selon la résolution spatiale atteignable: (i) les techniques d'imagerie adaptées pour l'étude de la macrocirculation sanguine (résolution spatiale de plusieurs centaines de micromètres), plutôt utilisées en clinique et (ii) les techniques d'imagerie adaptées pour l'étude de la microcirculation sanguine (résolution spatiale $< 100 \mu\text{m}$), surtout employées en imagerie préclinique. Après avoir présenté leurs principes biophysiques, nous comparerons les techniques d'imagerie sur la base des résolutions spatiotemporelles, du champ de vue et de l'invasivité. Nous concluons en présentant les avantages de la technique d'imagerie speckle, qui a été mis en œuvre dans cette thèse, et son potentiel de développement pour l'imagerie clinique de la microcirculation.

2 TECHNIQUES D'IMAGERIE CLINIQUE POUR L'ÉTUDE DE LA MACROCIRCULATION SANGUINE

2.1 IMAGERIE PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) repose sur un champ magnétique intense fixe qui détermine les orientations des spins (moments magnétiques). Ceux-ci sont alors perturbés transitoirement par une onde radiofréquence à une fréquence spécifique de l'espèce biologique ciblée (les protons, l'hémoglobine ou encore des intermédiaires métaboliques marqués à l'aide du ^{13}C). Un système de gradients de champs permet de localiser le signal dans des plans successifs et donc par reconstruction de produire des images 3D. L'IRM permet l'accès à de nombreux paramètres physiologiques via des séquences dédiées, dont les plus utilisées sont largement éprouvées et standardisées. En première approche, le contraste est déterminé par les temps de retour à la position d'équilibre des spins qui suivent un mouvement de précession (rotation autour de l'axe du champ magnétique externe) décrit par les temps de relaxation longitudinale T1 et/ou transversale T2.

L'IRM fonctionnelle (IRMf) peut s'appuyer sur différents mécanismes de contraste. Un premier mécanisme est purement endogène: le contraste provient d'une propriété intrinsèque du tissu, l'évolution du rapport de la concentration de désoxyhémoglobine paramagnétique par rapport à celle de l'oxyhémoglobine diamagnétique. L'étude fondatrice d'Ogawa (Ogawa et al., 1990) a démontré l'utilisation de la variation relative de la concentration de sang désoxygéné dans le cerveau comme signal fonctionnel IRM par le biais du mécanisme de contraste appelé BOLD pour « Blood Oxygen Level Dependent ». En IRMf BOLD, le contraste reflète une combinaison des changements d'oxygénation ou de volume sanguin locaux. En effet, les signaux T1 et T2 sont sensibles aux changements de susceptibilité magnétique résultant de l'intégration de facteurs biophysiques divers tels que la proportion relative des molécules d'hémoglobine oxygénées, la taille des vaisseaux sanguins, l'hématocrite, le débit sanguin et même la géométrie des vaisseaux (Katti et al., 2011; Guerraty et al., 2021). L'IRMf BOLD est particulièrement utile pour

cartographier indirectement l'activation neuronale qui se traduit localement par la variation du débit sanguin local ou de l'oxygénation qui conduisent à des fluctuations de l'ordre de quelques pourcents du signal BOLD. L'ASL (pour « Arterial Spin Labeling ») est une technique d'IRM utilisée pour mesurer le CBF sans agent de contraste. L'ASL utilise l'eau du sang artériel « marquée » magnétiquement comme traceur endogène pour mesurer la perfusion sanguine dans le cerveau. Le marquage magnétique de l'eau se fait par des impulsions magnétiques qui inversent la polarisation des protons. En mesurant la quantité de sang marqué atteignant les différentes régions du cerveau, l'ASL fournit une évaluation quantitative du débit sanguin (pour revue sur l'ASL, Telischak et al., 2015). Un second mécanisme de contraste en IRMf repose sur un agent de contraste exogène, souvent à base de gadolinium ^{64}Gd , administré généralement par voie intraveineuse. Le gadolinium est utilisé comme agent de contraste en raison de ses fortes propriétés paramagnétiques. Le gadolinium injecté dans le sang permet une meilleure visualisation des vaisseaux sanguins facilitant l'évaluation indirecte de la perfusion sanguine (Taoka et al., 2018). Cependant, les ions du ^{64}Gd seuls sont hautement toxiques, c'est pourquoi ils sont combinés à des substances chélatrices avant d'être utilisés à des fins médicales. La structure de la substance chélatrice détermine le comportement de l'agent de contraste dans l'organisme et son effet sur les temps de relaxation.

Un atout majeur de l'IRM est qu'elle permet de coupler lors d'un même examen l'imagerie anatomique pondérée en T1 de très haute résolution spatiale ($< 100 \mu\text{m}$) avec l'imagerie fonctionnelle pondérée en T2 qui elle possède une résolution plus modeste (de l'ordre $\geq 1 \text{ mm}^3$). Ainsi l'étude anatomofonctionnelle du cerveau complet peut être établie. La technique permet l'imagerie corps entier et est non-invasive à l'exception de l'injection de produit de contraste. Les améliorations apportées à l'IRM permettent désormais l'extraction de paramètres hémodynamiques tels que le volume plasmatique, la perméabilité capillaire, le débit sanguin et le volume sanguin avec des résolutions spatiotemporelles maximales de plusieurs centaines de micromètres et de millisecondes (Katti et al., 2011; Guerraty et al., 2021). En clinique, l'IRMf est un outil de choix pour le diagnostic et le suivi de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, la progression des tumeurs cérébrales, les AVC et les troubles vasculaires.

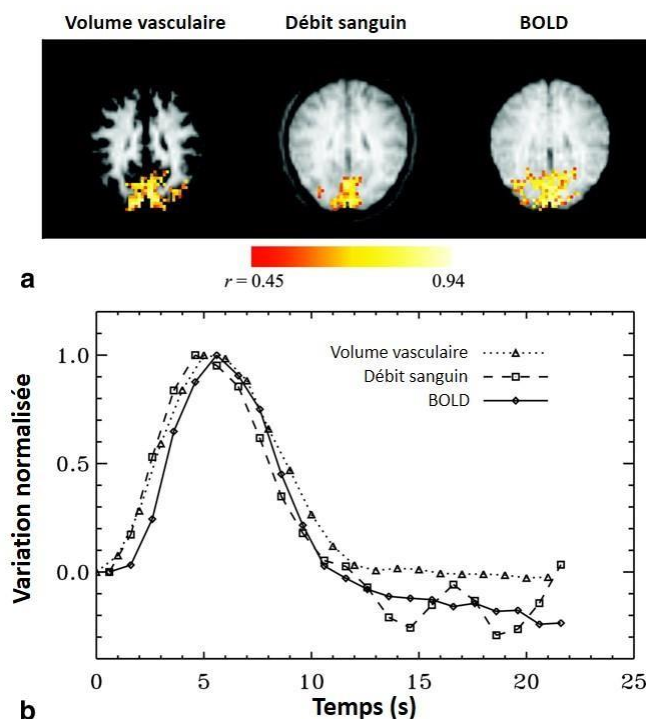


Figure II.3. IRM fonctionnelle du cerveau chez l'humain. (a) Exemple de cartes fonctionnelles du volume vasculaire, du débit sanguin et du signal BOLD acquises simultanément à la suite d'une stimulation visuelle liée à l'événement. La barre de couleur représente les coefficients de corrélation croisée (r). (b) Courbes de réponse moyennes (4 sujets) du volume vasculaire, de la perfusion et du signal BOLD dans les zones activées. (Adaptée de Y. Yang et al., 2004)

2.2 TOMOGRAPHIE PAR ÉMISSION DE POSITRONS

La Tomographie par Émission de Positrons (TEP ou PET pour « Positron Emission Tomography ») est une technique d'imagerie nucléaire utilisée en imagerie clinique pour l'identification de zones hyper- ou hypo- métaboliques à l'aide de l'accumulation intracellulaire d'un analogue du glucose, le ^{18}F -FDG (fluorodésoxyglucose), injecté préalablement à l'examen (Basu et al., 2011). Les isotopes utilisés sont des émetteurs de positrons dont l'annihilation, en deux photons gamma de 511keV émis dans des directions opposées, permet la détection sur une ligne. La reconstruction tomographique à partir des lignes d'interaction produit une image 3D. La technique développée dans les années 1990 a également été associée à ses débuts à l'imagerie de l'eau marquée ^{15}O -H $_2$ O pour quantifier le débit sanguin (Fox et al., 1986). Cette méthode était cependant limitée à une imagerie ponctuelle avec le passage d'un bolus de traceur de durée de vie très réduite (environ 2 minutes). Ceci posait également des contraintes pratiques importantes, en particulier la nécessité d'une synthèse de l'isotope au moment de l'expérience et des réinjections séquentielles. Plus récemment, la technique a été utilisée pour évaluer la microcirculation sanguine dans des vaisseaux de l'ordre des centaines de micromètres comme les artères coronaires (Camici et al., 2007) via l'utilisation d'ammoniaque marquée à l'aide de l'isotope ^{13}N injecté par voie intraveineuse, de durée de vie sensiblement plus longue (environ 10 minutes). Les images TEP

sont acquises à des intervalles réguliers afin de suivre le transit du traceur dans les voies sanguines. Les courbes cinétiques du traceur sont ensuite utilisées pour calculer le débit sanguin sur la base de modèles cinétiques compartimentaux simples. L'imagerie est poursuivie pendant plusieurs dizaines de minutes: la perfusion statique est d'abord acquise, puis une hyperémie est induite transitoirement dans une phase de « stimulation/stress » du protocole d'imagerie. Une deuxième dose de radiotracer est alors administrée et l'imagerie TEP est répétée. Le rapport entre le débit sanguin à l'effort et celui au repos permet également d'évaluer la fonction vasculaire (Klein et al., 2010). L'acquisition TEP dynamique et l'utilisation des modèles cinétiques permettent d'estimer les valeurs absolues du débit sanguin en ml/min/g de tissu. Malgré le potentiel quantitatif de l'utilisation de radio-isotopes pour mesurer les paramètres hémodynamiques, la technique reste limitée par le coût de l'instrumentation et des radiotraceurs ainsi que la disponibilité des radio-isotopes. Comme indiqué, la faible durée de vie des isotopes implique une imagerie rapide et des injections répétées, restreignant la possibilité d'imagerie dynamique. Bien que la technique permette d'imager la structure complète de l'organe (i.e. cerveau, cœur), elle n'est pas adaptée à l'étude de la microcirculation du fait de sa résolution spatiale limitée (de l'ordre de quelques mm³).

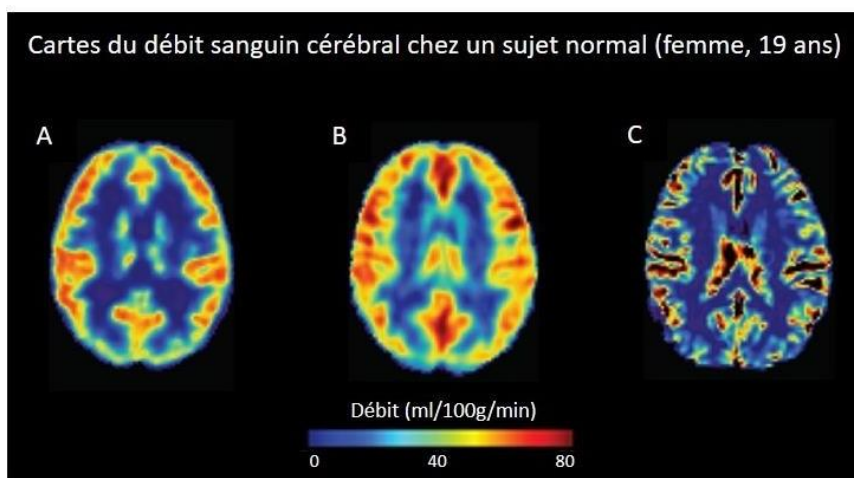


Figure II.4. Cartes du CBF chez un sujet normal (femme, 19 ans). (A) Mesure par TEP ¹⁵O-H₂O: la dynamique du radiotracer injecté est surveillée à l'aide d'une courbe d'activité temporelle. (B) Mesure par ASL: des images IRM du cerveau sont acquises pour capturer la dynamique de l'eau du sang marquée. Le débit sanguin peut être quantifié en ajustant les données d'imagerie acquises à des modèles cinétiques. (C) Mesure par IRM: un bolus d'agent de contraste à base de gadolinium est administré par voie intraveineuse pour permettre au traceur de passer à travers le lit capillaire dans le cerveau. Les images sont acquises à l'aide de séquences pondérées en T2 pour dériver le débit sanguin relatif. (Adaptée de M. Y. Zhao et al., 2023)

2.3 ANGIOGRAPHIE TOMOGRAPHIQUE X

La tomographie X assistée par ordinateur (CT pour « Computed Tomography ») est une autre modalité d'imagerie nucléaire qui fournit des images tridimensionnelles. La technique utilise les rayonnements X ionisants dont l'atténuation varie selon la densité des milieux traversés. Depuis ses premières applications cliniques, la performance de la technique s'est considérablement

améliorée suite aux progrès dans la technologie de l'imagerie (i.e. utilisation de multi-détecteurs de meilleure sensibilité) et à l'optimisation des algorithmes de reconstruction d'image (Willemink et al., 2019). Tous ces efforts ont contribué à réduire considérablement l'exposition des patients aux rayons X en diminuant la dose moyenne de rayonnement émis (Mahesh et al., 2007), et à améliorer les résolutions spatiale et temporelle (Hata et al., 2018) qui atteignent quelques centaines de micromètres et de millisecondes. Pour l'imagerie vasculaire anatomofonctionnelle, le scanner acquiert des images sous différents angles autour du corps du patient, après injection intraveineuse d'un agent de contraste radio-opaque. La reconstruction 3D d'une séquence d'images permet d'imager la morphologie de l'arborescence vasculaire et de quantifier le transport intravasculaire et extravasculaire de l'agent de contraste pour extraire des paramètres fonctionnels associés à la vascularisation. La technique fournit ainsi une évaluation rapide de la physiologie cérébrale en mesurant le débit sanguin et le volume sanguin cérébral, ce qui permet de détecter et d'évaluer un infarctus aigu par exemple. Il est possible de différencier le tissu cortical récupérable de l'infarctus aigu ce qui détermine le choix de traitement en cas d'AVC (Demeestere et al., 2020). La technique est aussi utilisée pour l'évaluation fonctionnelle des tumeurs ainsi que la réponse à diverses thérapies anti-tumorales (Trinidad López et al., 2019).

En résumé, l'imagerie angiographique CT offre une méthode non invasive (hormis l'injection d'un agent de contraste), en large champ, adaptée à l'imagerie d'une grande variété de pathologies vasculaires chez l'homme. Cependant, la résolution spatiale reste limitée à plusieurs centaines de micromètres ce qui limite son utilisation pour l'étude de la microcirculation sanguine. Enfin, l'utilisation d'un agent de contraste implique une mesure du passage du bolus de traceur ce qui limite les études dynamiques.

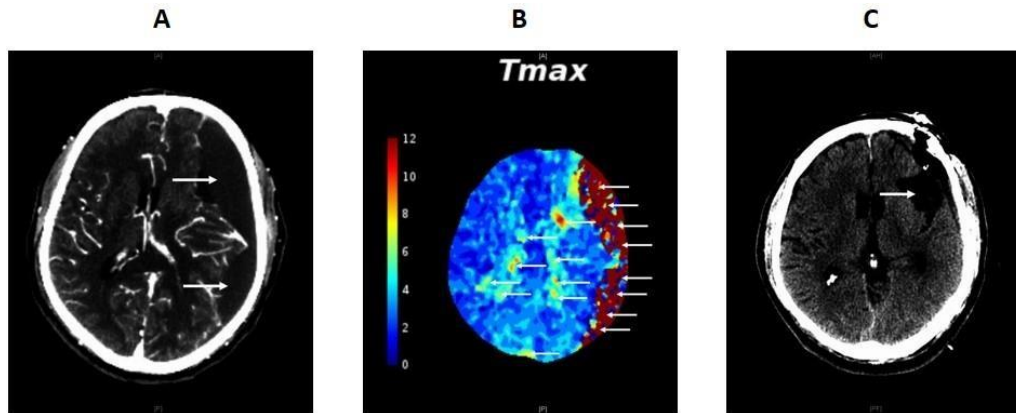


Figure II.5. Étude du débit sanguin cérébral par CT (avec agent de contraste exogène) pour la prise en charge d'un hématome sous-dural. (A) La CT-scan de la tête révèle un hématome sous-dural frontotemporopariétal gauche subaigu. (B) L'étude du débit sanguin cérébral par CT confirme l'hématome sous-dural et révèle des zones d'ischémie. T_{max} (en seconde) est le temps nécessaire à l'agent de contraste pour atteindre sa concentration maximale dans la région d'intérêt. (C) L'imagerie CT postopératoire de la tête confirme l'évacuation de l'hématome sous-dural. (Amidon et al., 2021)

2.4 IMAGERIE ULTRASONORE

L'imagerie ultrasonore ou échographie repose sur l'utilisation d'ondes sonores à haute fréquence pour visualiser les structures internes du corps en temps-réel. C'est une technique d'imagerie médicale non-invasive, simple de mise en œuvre et couramment utilisée en clinique. Un transducteur à ultrasons émet des ondes qui se propagent à travers les tissus. Lorsqu'elles rencontrent une interface entre deux tissus d'impédances acoustiques différentes, une partie de l'onde est réfléchie vers le transducteur, tandis qu'une partie continue de se propager plus profondément. Le transducteur piézoélectrique sert également de récepteur. Les informations spatiales et temporelles contenues dans le signal reçu sont utilisées pour reconstruire une image en temps-réel de la morphologie des tissus internes (Chan et al., 2011). Pour l'analyse des signaux fonctionnels vasculaires, c'est l'effet Doppler qui a d'abord été utilisé. Les ondes réfléchies par les globules rouges en mouvement subissent un décalage de fréquence dépendant de la vitesse des globules. Cette approche a été implémentée depuis les années 1960 aboutissant au « Doppler couleur » couramment utilisé en clinique pour obtenir des images 2D du débit relatif et de la direction du flux. L'imagerie ultrasonore du CBF a longtemps été fortement limitée par la barrière d'impédance acoustique très élevée que constitue la boîte crânienne. Pour contourner cette difficulté, l'imagerie transcrânienne par effet Doppler (fTCD) s'appuie sur des « fenêtres » acoustiques naturelles notamment celle située au niveau de la tempe. Néanmoins cette approche est limitée à l'imagerie de certaines zones de la macrocirculation et à une résolution spatiale maximale de l'ordre du millimètre (Knecht et al., 1998). Elle n'est pas applicable pour environ 10 à 20 % des patients. La fTCD est largement utilisée en clinique en particulier en conditions de soins intensifs chez l'adulte et en pédiatrie pour détecter des hémorragies, des occlusions, des traumatismes cérébraux et des modifications de la pression intracrânienne. Pour permettre l'imagerie du débit sanguin de la microcirculation, une approche développée depuis quelques années consiste à augmenter le signal disponible par injection de microbulles fortement échogéniques et qui restent confinées dans l'espace vasculaire (pour revue, D'Andrea et al., 2016). Cette approche a permis d'atteindre une résolution spatiale de l'ordre de quelques centaines de micromètres, adaptée à l'étude de la microvascularisation.

Au cours de la dernière décennie, les progrès de transducteurs multiéléments associés à des calculateurs puissants ont permis le développement d'une nouvelle approche extrêmement performante: l'imagerie fonctionnelle ultrasonore ultrarapide fUS. Elle repose sur l'acquisition des échos des ondes ultrasonores émises sous la forme de plans inclinés successifs. Chaque plan capture les informations à partir de multiples points dans le volume d'imagerie. Les échos ultrasonores reçus sont composés, de façon cohérente, pour former une image complète. Cette approche accélère l'acquisition des images assurant une résolution temporelle adaptée au temps-réel. Une image fUS de haute résolution spatiale (< à 100 μm) est alors reconstruite à partir d'images composées, correspondant à une résolution temporelle de plusieurs centaines de millisecondes. La technique d'acquisition est intrinsèquement multimodale: elle fournit des cartographies de la direction du flux en mode « Doppler couleur », mais également des variations

locales du volume sanguin via la mesure de la « puissance Doppler » (Mace et al., 2013). Initialement développée pour l'imagerie chez le rongeur (Mace et al., 2013), la méthode s'est rapidement améliorée et a été validée pour l'imagerie clinique peropératoire (Imbault et al., 2017), en imagerie pédiatrique (Demene et al., 2017) puis en association avec l'injection de microbulles pour l'imagerie transcrânienne avec une résolution anatomofonctionnelle inférieure à 100 μm (Demené et al., 2021). Des études de la réponse hémodynamique cérébrale à une stimulation sensorielle ont été réalisées tant en conditions normales que pathologiques (Provost et al., 2014; Imbault et al., 2017; Papadacci et al., 2020). L'imagerie fUS clinique combine plusieurs avantages: une résolution spatiotemporelle relativement élevée, la portabilité des appareils au lit du patient et l'absence d'une infrastructure dédiée comme en IRM ou en TEP. Le champ imagé n'est toutefois pas aussi large que pour les techniques corps entier. Enfin, la résolution et la sensibilité se dégradent avec la profondeur d'imagerie qui est de l'ordre de quelques centimètres.

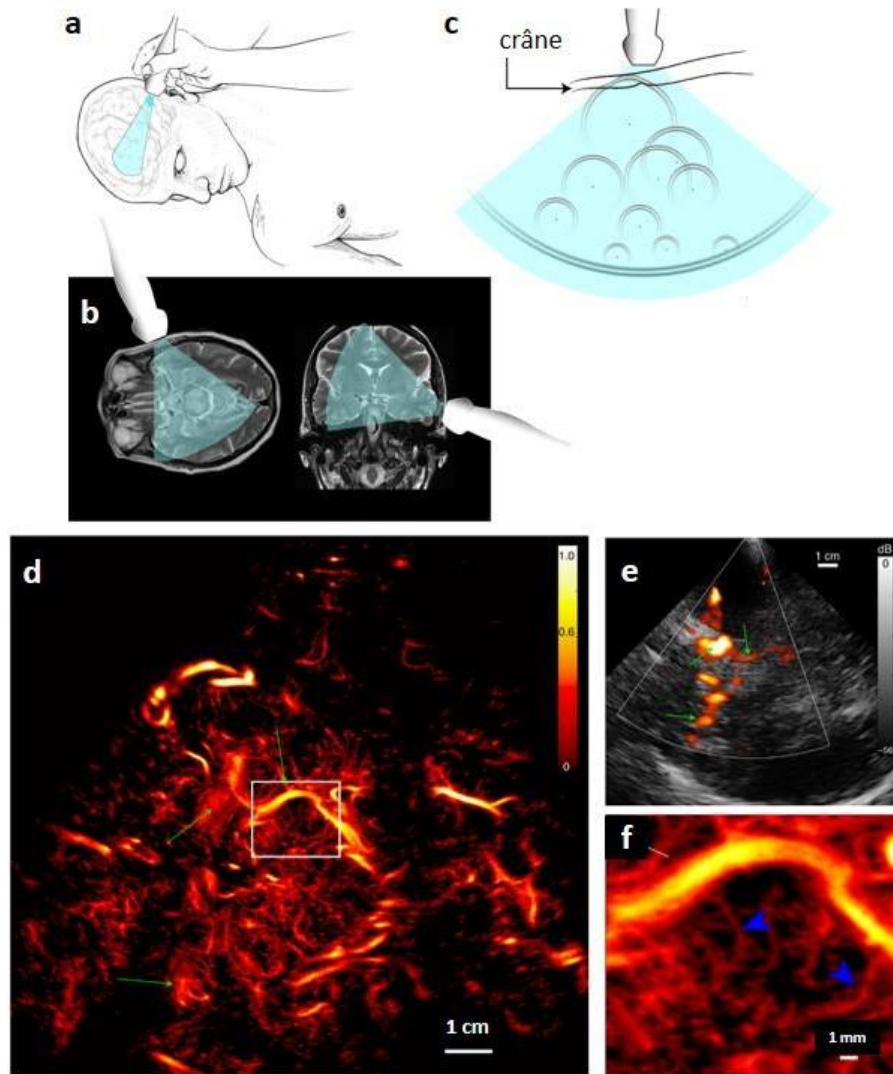


Figure II.6. Imagerie ultrasonore transcrânienne des vaisseaux cérébraux profonds chez l'homme. (a) Positionnement du transducteur ultrasonore sur la fenêtration temporelle de l'os pour l'imagerie du cerveau. (b)

Champ de vision typique en coupes transversale (gauche) et coronale (droite) du cerveau. (c) Des microbulles isolées rétrodiffusent des fronts d'ondes circulaires vers le réseau de transducteurs. (d) Après avoir suivi toutes les bulles dans le champ de vision, une carte de densité est reconstruite. (e) Image Doppler conventionnelle obtenue dans le même plan d'imagerie que (d). Les flèches vertes servent de repères pour la comparaison des images (d) et (e). Barre d'échelle = 1 cm. (f) Vue agrandie de la région dans l'encadré blanc en (d) (zone de 15 x 17 mm²). De petits vaisseaux pénétrants dans le mésencéphale (têtes de flèches bleues) sont visibles. Barre d'échelle = 1 mm. (Adaptée de Demené et al., 2021)

CONCLUSION SUR LES MÉTHODES CLINIQUES D'EXPLORATION DU DÉBIT SANGUIN

L'IRMf et la CT sont des techniques cliniques de référence pour de nombreuses pathologies. L'imagerie TEP est largement utilisée en clinique en association avec le ¹⁸F-FDG, un traceur du métabolisme énergétique pour la détection et le suivi des cancers. Les techniques ultrasonores ont connu un fort regain d'intérêt dans les dix dernières années avec des développements instrumentaux et méthodologiques majeurs qui permettent désormais d'imager non seulement la macrocirculation mais également la microcirculation *in vivo*. Elles se développent rapidement et bénéficient de l'absence de traceur (hormis les microbulles), d'une relative simplicité de mise en œuvre au lit du patient et d'un coût modéré. Un des inconvénients majeurs des techniques ultrasonores est la nécessité d'un contact direct entre le transducteur US et le tissu, et, pour les techniques transcrâniennes, la nécessité d'injections répétées ou continues de microbulles pour obtenir des signaux intenses et une résolution spatiotemporelle élevée (100 μm, quelques centaines de millisecondes). Malgré des progrès importants, l'imagerie fonctionnelle des vaisseaux de la microcirculation (< 100 μm) n'est pas possible actuellement en clinique. Dans la section suivante, nous verrons que des techniques de plus haute résolution spatiotemporelle sont développées et largement utilisées en imagerie préclinique sur modèles animaux pour l'imagerie morphologique et fonctionnelle de la microcirculation parmi lesquelles l'imagerie speckle qui présente un fort potentiel de développement pour l'imagerie clinique.

3 TECHNIQUES D'IMAGERIE PRÉCLINIQUE POUR L'ÉTUDE DE LA MICROCIRCULATION SANGUINE

Dans ce paragraphe, nous décrirons brièvement les techniques principalement acoustiques et optiques adaptées à l'étude du débit sanguin cérébral sur des modèles animaux de rongeurs (i.e. rats et souris). Nous présenterons les verrous physiques et technologiques pour l'application de ces méthodes en imagerie clinique de la microcirculation.

3.1 MICROSCOPIE DEUX PHOTONS

La microscopie de fluorescence à deux photons (TPLSM pour « Two Photon Laser Scanning Microscopy ») est une technique qui permet l'imagerie de fluorescence endogène ou exogène avec un sectionnement optique intrinsèque et une résolution cellulaire (< 1 μm). Contrairement à l'imagerie confocale, qui sélectionne les photons de fluorescence émise via un diaphragme

confocal, la TPLSM s'appuie sur un laser d'impulsions courtes (femtosecondes) et de forte puissance. L'excitation du fluorophore cible n'est obtenue qu'au point focal de l'objectif, seul endroit où la densité de photons présents permet une absorption simultanée de deux photons infrarouges nécessaires à l'excitation du fluorophore. Toute la fluorescence collectée vient donc exclusivement du plan d'excitation. L'image est réalisée par un balayage, point par point, du tissu par le laser et la détection de la fluorescence associée. La TPLSM utilise des longueurs d'onde élevées, généralement dans le domaine infrarouge, égales ou proches du double de la longueur d'onde visible d'absorption du fluorophore cible. Ces longueurs d'onde élevées correspondent à un domaine spectral où l'absorption et la diffusion de la lumière dans les tissus biologiques sont plus faibles que dans le visible. Ceci permet une imagerie à une profondeur sensiblement plus importante qu'en imagerie confocale. Il faut souligner que l'imagerie se fait après craniotomie partielle: une fenêtre de quelques mm² de la boîte crânienne est retirée pour exposer les tissus au faisceau laser. De nombreux efforts ont été menés pour rendre cette fenêtre pérenne et permettre le suivi longitudinal des animaux sur plusieurs semaines (Yang et al., 2010; Tournissac et al., 2022). Chez le rongeur, la TPLSM permet d'examiner les tissus jusqu'à 500 µm de profondeur contre 200 µm maximum en confocal avec des résolutions spatiales sensiblement identiques. Des études ont montré une imagerie dans les couches profondes du cortex murin (jusqu'à 1 mm) (Helmchen et al., 2005).

Du point de vue des paramètres hémodynamiques, la technique permet de mesurer les changements du débit au niveau d'un capillaire unique (Chaigneau et al., 2003). Un traceur « fluorescéine-dextran » est injecté, reste confiné dans le réseau vasculaire et ne pénètre pas dans les globules rouges. L'imagerie 3D de fluorescence à deux photons permet alors de visualiser l'arborescence vasculaire (Figure II.7.A). Après avoir identifié un capillaire sanguin dans le champ de vue, un balayage linéaire longitudinal rapide dans l'axe du capillaire (environ 15 µm/ms) montre le déplacement de l'ombre des globules rouges dans le plasma fluorescent. La pente des lignes enregistrées permet de mesurer la vitesse instantanée des globules rouges (Figure II.7.B) dans un capillaire individuel. Une perturbation de la vitesse sanguine absolue a été observée chez les souris diabétiques et en cas d'ischémie cérébrale au niveau de la MCA (Figure II.7) (J.Y. Huang et al., 2014). En outre, il a été montré que les artérioles et les veinules répondent différemment à la stimulation sensorielle et qu'une augmentation nette du réservoir de sang a lieu au niveau des artérioles suite à la stimulation somatosensorielle (Drew et al., 2011). La TPLSM est quasi-exclusivement utilisée en imagerie préclinique. Les limitations de la TPLSM sont son faible champ de vue (quelques centaines de µm²), la nécessité de balayage qui limite le nombre de capillaires imagés simultanément, la nécessité d'une source laser coûteuse et une profondeur d'imagerie limitée à quelques centaines de micromètres.

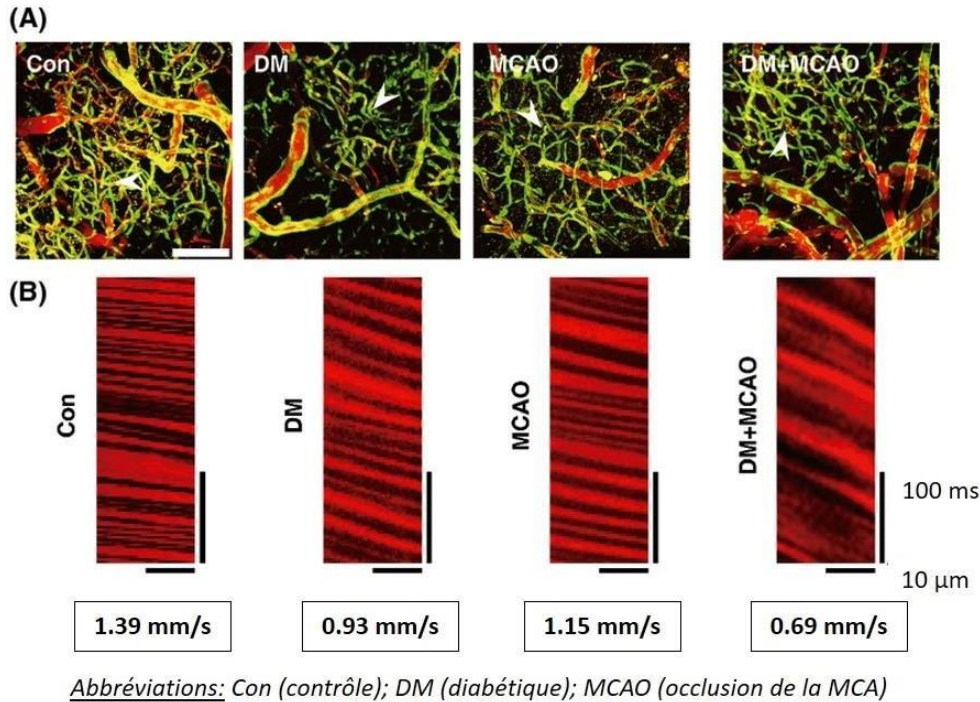


Figure II.7. Le diabète augmente les perturbations de la vitesse des globules rouges dans les capillaires cérébraux en cas d'ischémie cérébrale. (A) TPLSM en conjonction avec le marquage du plasma sanguin par le « Texas Red Dextran » utilisé pour cartographier l'angio-architecture des capillaires chez des souris témoins (Con), diabétiques (DM), ayant subi une occlusion de la MCA (MCAO), et diabétiques avec occlusion de la MCA (DM+MCAO). Barre blanche = 100 μm . (B) Données de balayage linéaire du débit sanguin dans les capillaires des différents groupes de souris. (Adaptée de J.Y. Huang et al., 2014)

3.2 TOMOGRAPHIE PAR COHÉRENCE OPTIQUE

La tomographie par cohérence optique (OCT pour « Optical Coherence Tomography ») est une technologie d'imagerie qui produit des images transversales à haute résolution de la microstructure interne des tissus vivants (Fujimoto et al., 2000). Elle utilise la rétrodiffusion de la lumière par les tissus éclairés à l'aide d'une source de faible cohérence temporelle. Dans son approche la plus simple, la lumière rétrodiffusée est généralement détectée dans une configuration d'interféromètre de Michelson divisé en deux bras: un bras de référence et un bras de mesure. L'interférence des deux faisceaux de lumière réfléchi donne une figure d'interférence qui contient des informations sur le chemin suivi par la lumière dans le bras de mesure (Huang et al., 1991). L'OCT utilise un éclairage à large spectre, ce qui signifie que l'interférence ne se produit que pour les photons dont la longueur du trajet est incluse dans la courte longueur de cohérence de la source. Il en découle une capacité de sectionnement optique de l'OCT qui permet d'imager des structures microscopiques dans les tissus à des profondeurs de plusieurs millimètres avec une résolution spatiale légèrement supérieure au micromètre. Initialement développée selon une approche temporelle, la technique a évolué vers des techniques dans le domaine fréquentiel permettant une augmentation de la rapidité d'acquisition au détriment de la simplicité instrumentale. Quelle que

soit l'approche, l'OCT fournit d'abord des informations morphologiques à une résolution quasi-cellulaire (Fujimoto, 2003). En ce qui concerne la microcirculation, l'OCT peut imager de petits vaisseaux sanguins (de l'ordre des micromètres) jusqu'à 1 à 2 mm sous la surface (Schmitt et al., 1995; Guerraty et al., 2021).

L'OCT Doppler est une variante qui permet de mesurer le débit sanguin relatif avec une résolution spatiale de l'ordre de quelques micromètres et une sensibilité élevée permettant d'apporter une information fonctionnelle au-delà de l'imagerie structurale. Cependant, cette approche est fortement limitée par un compromis nécessaire entre la résolution spatiale et la sensibilité au flux. Zhao et al. ont démontré la première imagerie *in vivo* de la vascularisation et du débit sanguin chez des patients en utilisant l'OCT Doppler résolu en phase (Zhao et al., 2001). Cependant, cette méthode est sensible à l'orientation du flux sanguin, et les résultats sont optimaux lorsque la direction du flux est alignée avec le faisceau de la sonde, ce qui est complexe à obtenir expérimentalement. L'angiographie OCT (OCTA) est une variante de l'OCT de haute résolution spatiale qui a la capacité de fournir des mesures de la morphologie vasculaire et de la perfusion pour les capillaires sanguins ($< 10 \mu\text{m}$) jusqu'à une profondeur de pénétration de 2 millimètres. Elle est devenue une technique clinique de référence pour l'angiographie en ophtalmologie (Lains et al., 2021), ainsi que pour la recherche préclinique en cancérologie (Vakoc et al., 2012) et en neurosciences (Pujari et al., 2021).

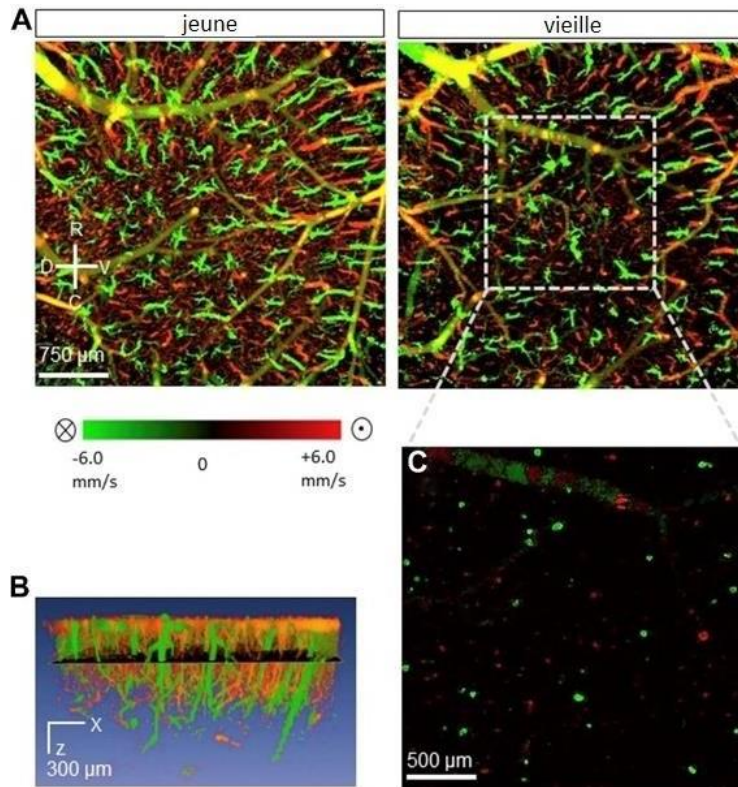


Figure II.8. Comparaison des cartes de vitesse sanguine et de la vascularisation cérébrale évaluées par OCTA chez la souris. (A) Cartes de vitesse axiale bidirectionnelle de souris jeune et âgée dans une épaisseur

de 300 μm à partir de la surface corticale. La barre de couleur représente la vitesse axiale des globules rouges du flux descendant (négatif, vert) et ascendant (positif, rouge) du cerveau. La couleur jaune a été générée à partir d'un mélange de signaux verts et rouges. (B) Visualisation tridimensionnelle des vaisseaux descendants et ascendants dans la région quadrillée en blanc de (A). (C) Coupe orthogonale de (B), à 50 μm sous la surface corticale. Les points verts et rouges représentent respectivement les artérioles descendantes et les veinules ascendantes dans le plan X-Y sélectionné. (Adaptée de Y. Li et al., 2018)

3.3 IMAGERIE PHOTO-ACOUSTIQUE

Au-delà des techniques ultrasonores utilisées en clinique (cf. section II.2.4), de nombreuses applications des ultrasons ont été développées pour l'étude des modèles animaux comme l'imagerie photo-acoustique et l'imagerie fonctionnelle ultrarapide fUS (cf. section II.3.4).

En imagerie photo-acoustique fonctionnelle, une source laser de lumière monochromatique, rouge ou infrarouge, est utilisée pour illuminer les tissus, point par point, par balayage comme en TPLSM. L'absorption de la lumière dans le tissu, principalement par l'hémoglobine, crée une augmentation de température locale, qui génère à son tour une onde de pression ultrasonore. Ce signal permet la détection indirecte de l'activation somatosensorielle chez le rongeur (Zhang et al., 2018). La détection d'ultrasons, au lieu de photons, permet de s'affranchir des limites en résolution spatiale liées à la forte diffusion de la lumière dans les tissus. Comme la TPLSM, cette technique nécessite de réaliser une craniotomie pour exposer les tissus cérébraux. Différents agents de contrastes ont été explorés pour cette technique afin d'améliorer le contraste et permettre une meilleure visualisation des structures tissulaires (pour revue, J. Weber et al., 2016). Par exemple, les nanoparticules d'or ou d'argent ont la capacité d'absorber la lumière laser et de générer des signaux photo-acoustiques puissants, facilement visualisables dans les tissus. D'autres approches reposant sur le même principe ont utilisé des nanopolymères ou encore des colorants organiques comme le vert d'indocyanine, parfois utilisé aussi en imagerie photo-acoustique clinique (Teng et al., 2021). En pratique, la résolution spatiale de l'imagerie photo-acoustique se situe dans la plage des dizaines à quelques centaines de micromètres. Comme pour toutes les modalités à balayage, la technique reste limitée pour des applications en temps-réel sur un champ large sans recours à une combinaison de techniques d'acquisition rapide, de traitement du signal efficace et de puissance de calcul informatique suffisante (pour revue sur l'imagerie photo-acoustique, Xu et al., 2006).

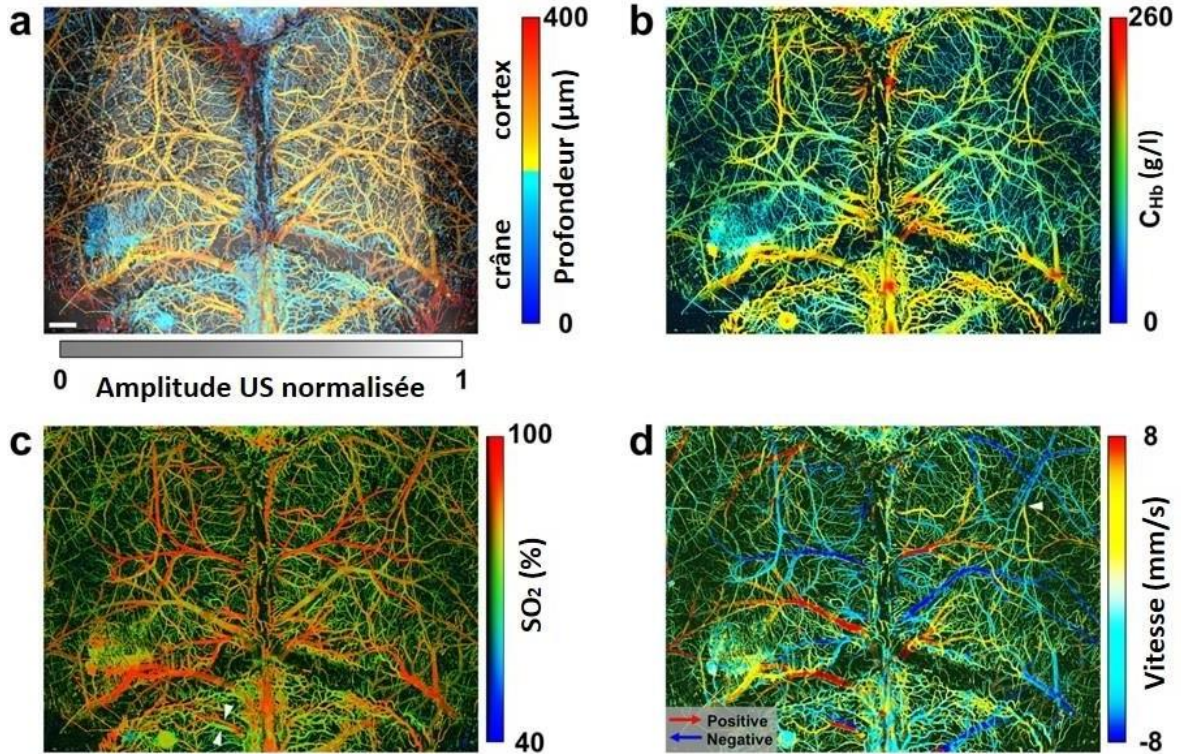


Figure II.9. Imagerie photo-acoustique microscopique du cerveau de la souris. (a) Vascularisation codée en profondeur. (b) Carte de la concentration en hémoglobine (C_{Hb}). (c) Carte de la saturation en dioxygène (SO_2). Les flèches indiquent une paire d'artérioles et de veinules corticales identifiées par leurs valeurs distinctes de SO_2 . (d) Carte de la vitesse sanguine. Les flèches rouges et bleues indiquent les directions du flux le long de l'axe de balayage et la flèche blanche indique une artériole dont l'orientation est presque orthogonale à l'axe de balayage. Barre d'échelle blanche: 0.5 mm. (Adaptée de Ning et al., 2015)

3.4 IMAGERIE FONCTIONNELLE ULTRASONORE ULTRARAPIDE

Le principe de l'imagerie ultrasonore fonctionnelle ultrarapide (fUS) a déjà été décrit dans la section II.2.4. Cette technique développée depuis une dizaine d'année (Mace et al., 2013) permet de visualiser les variations locales du volume sanguin directement liées au débit sanguin relatif (Tanter et al., 2014; Tiran et al., 2015). Sur les modèles animaux, la petite dimension des zones à imager, la faible épaisseur de la boîte crânienne et/ou la possibilité de réaliser une fenêtre acoustique, permettent d'atteindre une bonne sensibilité aux variations hémodynamiques avec une résolution spatiale de l'ordre de 100 μm , à la limite de la microcirculation, et jusqu'à 10 mm de profondeur. Cela a conduit à l'imagerie du cerveau entier dans des temps d'acquisition de l'ordre des dizaines de secondes (Errico et al., 2015). De plus, des mesures d'activation sensorielle en 3D ont été obtenues chez le petit animal (Osmanski et al., 2014; Demene et al., 2015; Tiran et al., 2017; Bertolo et al., 2021).

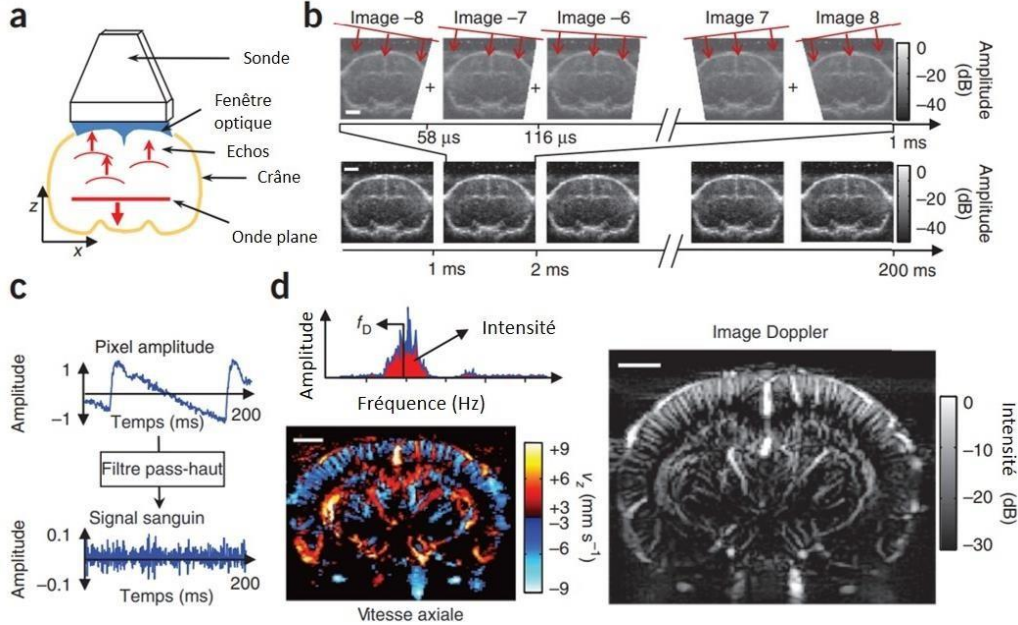


Figure II.10. Imagerie fUS dans le cerveau du rat. (a) Schéma du système d'imagerie décrivant la sonde ultrasonique, la fenêtre crânienne et un schéma d'une coupe coronale du cerveau du rat. (b) L'imagerie fUS est réalisée en émettant des ondes ultrasoniques planes inclinées à différents angles dans le cerveau du rat. Les échos ultrasonores produisent des images de $2 \times 2 \text{ cm}^2$. La somme de ces images donne une image composée acquise en 1 ms. Une séquence complète consiste à acquérir 200 images composées en 200 ms. (c) Variation temporelle de l'amplitude des ultrasons rétrodiffusés dans un pixel (normalisée par l'amplitude maximale). Le signal sanguin est extrait en appliquant un filtre passe-haut. (d) Spectre de fréquence du signal sanguin. Deux paramètres sont extraits de ce spectre: la fréquence centrale, qui est proportionnelle à la vitesse axiale du sang par rapport à l'axe z et donne lieu à l'image de la vitesse axiale v_z ; et l'intensité, qui est proportionnelle au volume sanguin cérébral et donne lieu à l'image Doppler. L'imagerie ultrasonore fonctionnelle est basée sur les images « Doppler puissance ». Les barres d'échelle correspondent à 2 mm. (Adaptée de Mace et al., 2013)

3.5 IMAGERIE LASER DOPPLER

La mesure du débit par laser Doppler (LDF pour « Laser Doppler Flowmetry ») est une technique développée dans les années 60 pour la mesure des changements de débit sanguin de façon non invasive, par exemple à la surface de la peau d'un membre. Comme pour le « Doppler ultrason », la technique repose sur la mesure du décalage en fréquence de l'onde réfléchi par les globules rouges en mouvement illuminés par une source de lumière cohérente (Micheels et al., 1984). La mesure est généralement locale via une sonde optique fibrée au contact du tissu. Elle mesure le débit sanguin relatif en unité arbitraire (« Blood Flow Unit » ou BFU). Pour obtenir une cartographie 2D des variations du débit sanguin, il est nécessaire de balayer rapidement l'échantillon point par point. La technique, initialement clinique, a été utilisée pour cartographier les variations du débit sanguin dans le cortex exposé du rongeur (Dirnagl et al., 1989; Kilic et al., 2004; Tota et al., 2010). L'utilisation de la LDF reste limitée pour l'étude de la microcirculation vue sa résolution spatiale relativement grossière (centaines de micromètres) et sa résolution temporelle (de l'ordre des secondes) au-delà de l'échelle de variation du débit sanguin au niveau

microvasculaire. Pour remédier aux limitations de résolutions temporelle et spatiale de la LDF, l'imagerie du contraste speckle dynamique a été proposée. Elle est détaillée dans la section suivante.

3.6 IMAGERIE DU CONTRASTE LASER SPECKLE

L'imagerie du contraste laser speckle (LSCI pour « Laser Speckle Contrast Imaging ») a été proposée comme une alternative sans balayage à l'imagerie LDF et s'est avérée équivalente en termes de signaux biophysiques pouvant être extraits (Bonner et al., 1981). Cette technique permet de cartographier le débit sanguin en surface, sans traceur exogène, avec une résolution spatiale de l'ordre de quelques dizaines de micromètres et une résolution temporelle de quelques dizaines de millisecondes.

La LSCI à exposition simple (S-LSCI) est la première version de la technique qui repose sur une acquisition des images à un temps d'exposition unique. Elle est basée sur l'analyse des propriétés statistiques de la figure d'interférence dynamique produite par la superposition de photons d'une lumière cohérente diffusée avec des longueurs de chemin optique différentes (Goodman, 1975). Lorsqu'un échantillon éclairé par une lumière cohérente est imagé, un motif granulaire appelé speckle est produit. Si l'échantillon contient des particules diffusantes en mouvement, le motif de speckle varie avec le temps. Les propriétés statistiques des variations temporelles et spatiales de l'intensité de ce motif renseignent indirectement sur le mouvement des particules diffusantes. L'approche la plus utilisée en imagerie du vivant est le calcul des variations du contraste de speckle local dans l'image fournissant une mesure indirecte des variations relatives du débit sanguin: plus le flux est rapide, plus le contraste mesuré est faible. La technique MESI (« Multiple Exposure Speckle Imaging » ou imagerie speckle à exposition multiple) est une variante de la technique LSCI. La différence est que les images de contraste sont acquises successivement à différents temps d'exposition. Ensuite, un ajustement non-linéaire aux données de contraste permet l'extraction du débit sanguin relatif. Cette variante de la technique a été introduite comme amélioration de la S-LSCI afin de prendre en compte la contribution des diffuseurs statiques (i.e. os, peau et cartilage) au contraste speckle ainsi que la contribution des bruits instrumentaux (Parthasarathy et al., 2008).

La technique LSCI est largement utilisée pour la cartographie *in vivo* des changements relatifs du débit sanguin dans le cortex chez le petit animal (Durduran et al., 2004; Weber et al., 2004; Dunn et al., 2005; Takuwa et al., 2011; Soleimanzad et al 2017). De plus, la technique MESI a été appliquée *in vivo* à des jeunes souris anesthésiées pour l'imagerie non invasive transcrânienne du débit sanguin (Parthasarathy et al., 2008; Soleimanzad et al., 2017).

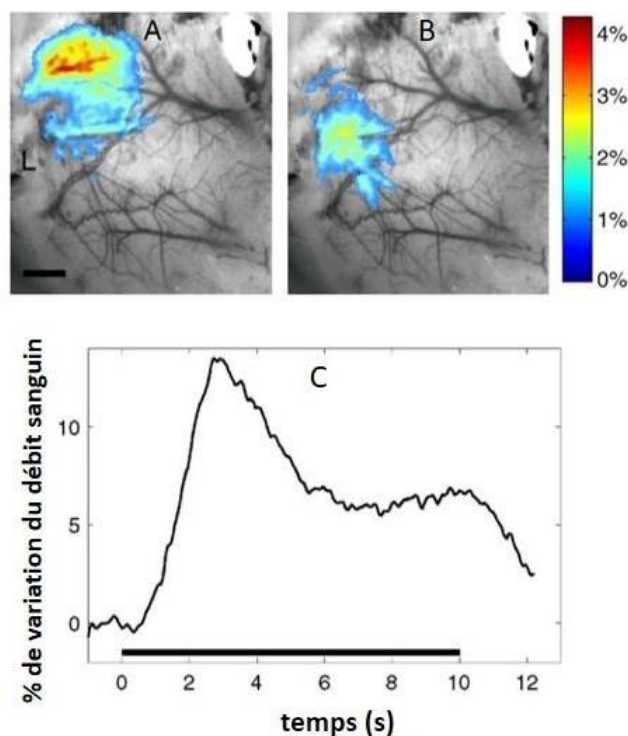


Figure II.11. Réponse hémodynamique à la suite de la stimulation somatosensorielle de la patte et des vibrisses chez le rat. (A) Variation en pourcentage de l'hémoglobine totale en réponse à la stimulation de la patte. Barre d'échelle = 1 mm. (B) Variation en pourcentage de l'hémoglobine totale en réponse à la stimulation des vibrisses. (C) Variation en pourcentage du CBF en réponse à une stimulation de 10 secondes de la patte avant. Le graphique montre la variation sur une région d'intérêt de $1.75 \times 1.75 \text{ mm}^2$ centrée sur l'activation. (Adaptée de Dunn et al., 2005)

3.7 SPECTROSCOPIE OPTIQUE DU CONTRASTE SPECKLE

De nouvelles approches, ont été développées pour tenter de dépasser les limites propres à l'imagerie du contraste speckle: faible profondeur de mesure et absence de quantification absolue. La spectroscopie optique du contraste speckle (SCOS) a été introduite pour mesurer le débit sanguin relatif dans les tissus profonds (Valdes et al., 2014). Cette technique combine les capacités d'analyse des tissus profonds de la spectroscopie de corrélation diffuse (DCS) et l'analyse du contraste speckle MESI. La profondeur est déterminée par la distance entre la source d'émission et le détecteur. Les photons recueillis sont ceux qui ont voyagé le long d'une trajectoire en forme de banane (Figure II.12). Pratiquement, une source ponctuelle balaie la surface des tissus et la lumière est recueillie par une caméra. Chaque pixel constitue une paire de source-détecteur, avec la source ponctuelle de balayage. La SCOS a été validée dans des fantômes et *in vivo* chez les rongeurs (Dragojević et al., 2017) comme chez l'homme (Dragojević et al., 2018) dans des approches multi-distance ou multi-exposition. La dépendance du contraste speckle par rapport à la distance source-détecteur et à la durée d'exposition est décrite par un modèle mathématique auquel un ajustement est nécessaire pour l'estimation du débit sanguin (Valdes et al., 2014; Dragojević et al., 2017, 2018).

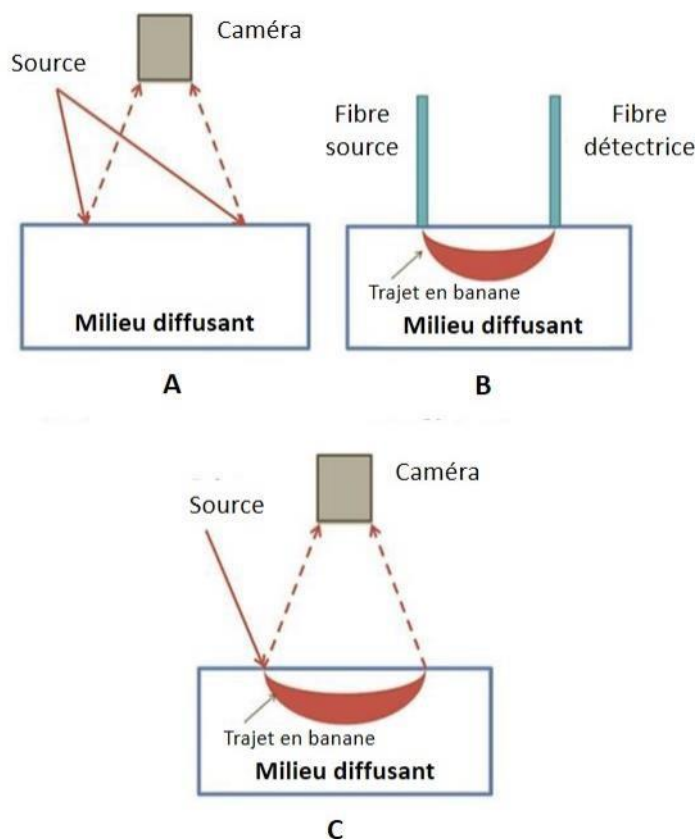


Figure II.12. SCOS combine le principe de l'imagerie de speckle en surface et la spectroscopie DCS. (A) Imagerie speckle. (B) Imagerie DCS. (C) Imagerie SCOS. (Adaptée de la thèse de Valdès PC, 2014)

L'un des enjeux de la thèse a été de lever les contraintes techniques permettant d'envisager l'utilisation de l'approche MESI en champ large et en temps-réel pour répondre aux contraintes de l'imagerie clinique. La théorie de l'imagerie speckle et les solutions techniques mise en œuvre sont détaillées dans le Chapitre III. Dans le paragraphe suivant, nous faisons la synthèse de performances en résolution spatiotemporelle, profondeur d'imagerie, taille de champ de vue et invasivité des différentes techniques d'imagerie déjà présentées dans le but de mettre en avant les avantages de l'imagerie speckle et son fort potentiel de développement pour les études cliniques en champ large.

4 COMPARAISON DES PERFORMANCES ET LIMITES DES DIFFÉRENTES MODALITÉS D'IMAGERIE

Le Tableau II.2 résume les bases biophysiques et les signaux physiologiques accessibles pour les différentes modalités d'imagerie décrites dans ce chapitre. La Figure II.13 présente les performances et domaines d'application des différentes techniques d'imagerie utilisées pour l'étude de la circulation sanguine tant en clinique qu'en préclinique. Les différentes modalités se distinguent par leurs résolutions spatiales et temporelles, les paramètres biologiques mesurables, le champ de vue possible et la profondeur de pénétration. Les techniques macrocirculatoires (IRM, TEP, CT et US) sont particulièrement pertinentes en imagerie clinique. Hormis le besoin

d'injection de produits de contraste dans certains cas, ces techniques sont de nature non-invasive. Néanmoins, les techniques IRM et TEP nécessitent une instrumentation complexe et coûteuse. De plus leurs résolutions spatiales de l'ordre du millimètre cube ou de quelques centaines de micromètres limitent leur emploi pour l'imagerie fonctionnelle microcirculatoire vu qu'elles ne permettent pas d'imager des vaisseaux sanguins unitaires à l'échelle des artérioles/capillaires. Quant à la profondeur de pénétration, l'IRM la PET et la CT sont capables d'imager la structure complète des organes (« corps entier ») mais ceci aux dépens de la résolution spatiotemporelle. Pour les techniques US cliniques, des images de structures profondes jusqu'à plusieurs centimètres peuvent être obtenue, mais la résolution spatiale se dégrade avec la profondeur. Les variantes des techniques ultrasonores employées en préclinique sont particulièrement prometteuses, notamment dans leur variante ultrarapide où elles ont montré une résolution jusqu'au niveau des artérioles dans les tissus profonds. Particulièrement, la technique fUS, basée sur le couplage neurovasculaire, a une résolution spatiotemporelle et une sensibilité élevées et son emploi en clinique est propice surtout pour les nouveau-nés et l'imagerie chirurgicale peropératoire (Couture et al., 2018). Néanmoins, le contact direct avec le tissu reste nécessaire ce qui n'est pas toujours possible et constitue une limite essentielle de cette approche. Enfin, la relation entre le signal mesuré et le flux sanguin demeure complexe à extraire. La variante photo-acoustique est aussi intéressante pour l'étude de la microcirculation. Pour l'imagerie, le faible intensité des signaux disponible combinée à la nécessité de balayage rendent la technique moins peu adaptée pour des applications en temps-réel sur un champ large sans recours à une instrumentation complexe pour l'acquisition et le traitement rapides des images (pour revue, Xu et al., 2006). Des dispositifs cliniques existants s'appuient sur la LDF (LDF, Moor Instruments; LDPM, Perimed) et fournissent une imagerie avec une résolution millimétrique, du flux sanguin en surface, donnée en unité de flux relatif. Néanmoins, la LDF est également restreinte en champ de vue et résolution temporelle par la nécessité d'un balayage. Quant à la TPLSM, malgré sa résolution spatiotemporelle excellente pour l'étude de la microcirculation à l'échelle des capillaires, son emploi reste limité aux études sur les modèles animaux du fait des contraintes instrumentales complexes en milieu clinique et d'un champ de vue très limité. Un outil clinique commercial, basé sur la TPLSM, a été proposé pour l'évaluation de la microcirculation cutanée (DermaInspect, 2016). Par ailleurs, une étude récente a suggéré l'association de l'imagerie fUS à la TPLSM pour améliorer la résolution spatiale de la fUS (Renaudin et al., 2022). Cette technique, la fULM pour « Functional Ultrasound Localization Microscopy », a permis l'imagerie transcânienne chez le rongeur anesthésié durant l'activation somatosensorielle. Malgré l'amélioration significative de la résolution spatiale (16 fois supérieure) par rapport à la fUS, des efforts doivent encore être investis pour permettre l'imagerie en champ large du cerveau. Concernant l'OCT, la résolution spatiotemporelle est très bonne et permet de combiner les imageries morphologique et fonctionnelle. Néanmoins, la pénétration limitée et le besoin de contact avec le tissu limite son utilisation pour la mesure du CBF. Cette technique s'est fortement développée avec des appareils commerciaux dans le domaine clinique en particulier pour les zones optiquement accessibles comme les mesures cutanées (DAMAE MEDICAL) et ophtalmologiques (Optovue OCT & Angio OCT; ZEISS Meditec France, Medical Technology).

Pour permettre l'imagerie du CBF, les techniques précliniques exigent en général une intervention invasive, via une craniotomie partielle. Certaines études ont proposées l'imagerie transcrânienne mais ceci au détriment de la résolution spatiale ou de la profondeur d'imagerie (Purkayastha et al., 2013; Renaudin et al., 2022). De plus une injection d'agent de contraste exogène reste souvent nécessaire pour améliorer la qualité du signal (par exemple, la fluorescéine en TPLSM et les microbulles en fUS).

Imagerie du débit sanguin	Source de contraste	Paramètres mesurables	
Approches macrocirculatoires	IRM	Modification des propriétés magnétiques locales Produit de contraste	Débit sanguin Volume sanguin Oxygénation Perméabilité
	TEP	Radiotracteur	Débit sanguin Réserve du flux sanguin
	CT	Produit de contraste (souvent à base d'iode)	Débit sanguin Volume sanguin Architecture vasculaire
Approches macro- et micro- circulatoires	US	Réflexion d'ultrasons: changement d'impédance acoustique, Doppler (parfois associée à un agent de contraste exogène)	Morphologie vasculaire Vitesse relative des globules rouges (Doppler) Variation de volume sanguin local (fUS)
Approches microcirculatoires	OCT	Méthode interférométrique (changement d'indice, Doppler)	Morphologie vasculaire Débit sanguin
	TPLSM	Fluorescence	Morphologie vasculaire Débit sanguin Volume sanguin Vitesse absolue des globules rouges
	LSCI	Propriétés statistiques des figures interférométriques	Débit/Vitesse du sang

Tableau II.2. Tableau récapitulatif (non exhaustif) des techniques d'imagerie utilisées pour la mesure du débit sanguin avec les mécanismes de contraste et les paramètres physiologiques mesurables associés.

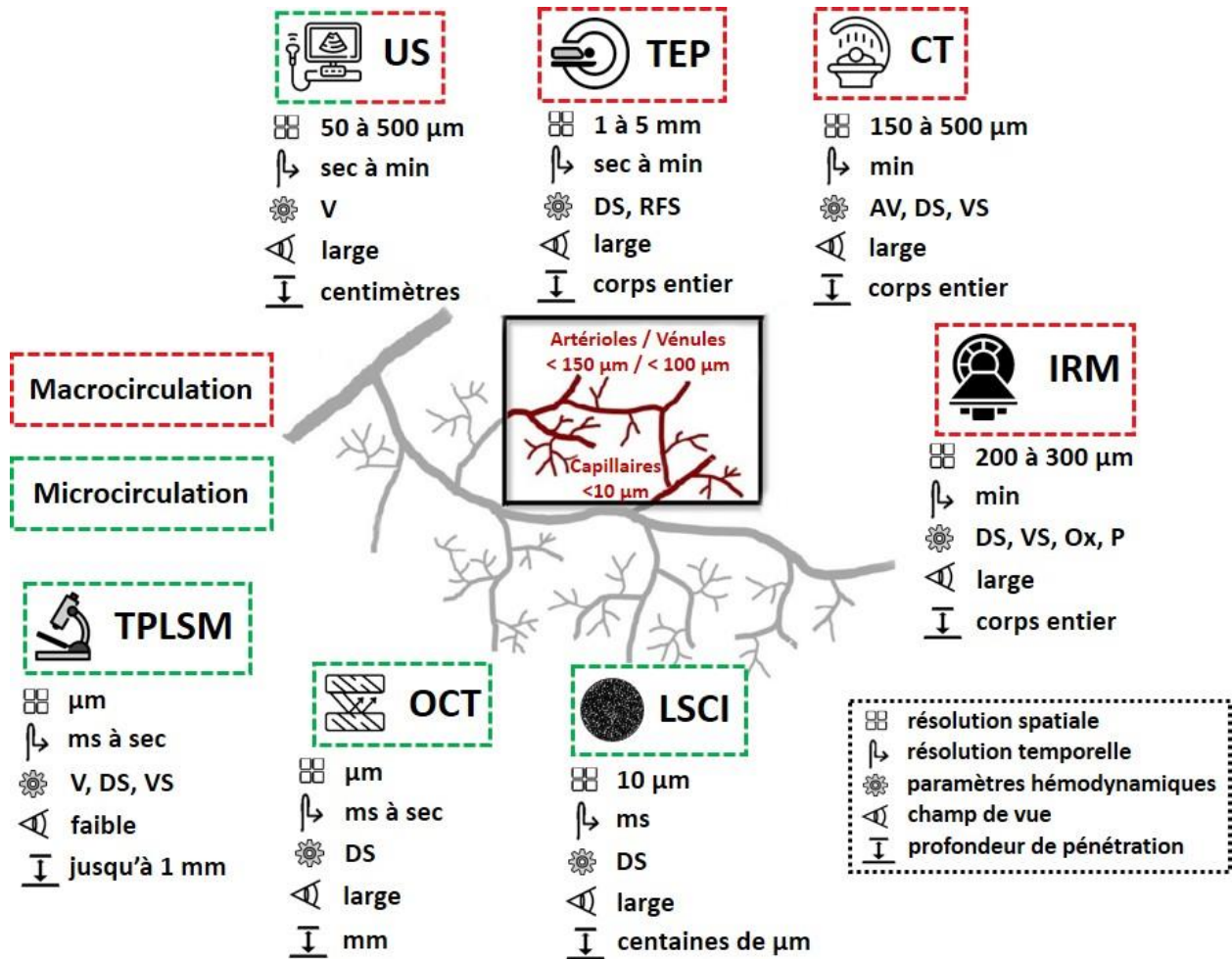


Figure II.13. Comparaison des modalités d'imagerie utilisées pour l'évaluation de la circulation sanguine quant à la résolution spatiale, la résolution temporelle, les paramètres hémodynamiques mesurables, le champ de vue et la profondeur de pénétration. Les encadrés rouges représentent les techniques d'imagerie relatives à la macrocirculation ($> 100 \mu\text{m}$) tandis que les encadrés verts correspondent aux techniques d'imagerie pour la microcirculation ($< 100 \mu\text{m}$). DS: débit sanguin, VS: volume sanguin, AV: architecture vasculaire, V: vitesse des globules rouges, RFS: réserve du flux sanguin, P: perméabilité vasculaire. (Adaptée de Guerraty et al., 2021) (Devor et al., 2012; Scholkmann et al., 2014; Hata et al., 2018; Park et al., 2018; Prasad et al., 2019; Guerraty et al., 2021)

Comme déjà évoqué, l'étude de la microcirculation sanguine présente plusieurs intérêts en clinique surtout pour le diagnostic des troubles de la circulation sanguine et des altérations précoces de la microcirculation qui peuvent être des signes précurseurs de certaines maladies. Il apparaît donc nécessaire aujourd'hui d'apporter des améliorations aux techniques d'imagerie microcirculatoire pour faciliter leur mise en pratique en clinique. Ce travail a déjà été largement entamé en imagerie fonctionnelle ultrasonore fUS, mais pour des résolutions spatiales qui restent encore à la limite haute de la microcirculation. Dans ce contexte, le développement de l'imagerie du contraste speckle LSCI est une voie qui présente plusieurs atouts:

- (i) Une haute résolution spatiotemporelle ($\sim 10 \mu\text{m}$, $\sim 10 \text{ms}$)
- (ii) Une mesure de signaux endogènes sans injection de traceur
- (iii) Une mesure sans contact
- (iv) Une mesure possible sur un large champ de vue, au lit du patient
- (v) Un coût modéré

De ce fait, plusieurs groupes ont déjà proposé et pour certains mis en œuvre la LSCI en milieu clinique. Elle a déjà été implémentée en milieu peropératoire sous sa variante simple exposition (S-LSCI) tandis que l'application clinique de son approche multi-expositions (MESI) reste très limitée (cf. Tableau II.3). Tous les appareils commerciaux existants s'appuient sur la S-LSCI (LASCA, Perimed; LSCI, Moor Instruments; PerfusiX-Imaging, LIMIS) bien que celle-ci ne permette qu'une approche quantitative biaisée du débit sanguin en présence de diffuseurs statiques, ce qui est systématiquement le cas en milieu clinique. La variante MESI a été validée en imagerie préclinique pour remédier à ce problème. Néanmoins, cette approche n'a jusqu'à présent pas été adoptée par les fabricants du fait de contraintes importantes tant en instrumentation qu'en lourdeur computationnelle pour la gestion de larges volumes de données et la durée de l'analyse incompatibles avec les contraintes cliniques.

Étude	Modalité	T	Champ de vue	Taille d'un pixel	Images/seconde
Intraoperative monitoring of cerebral blood flow by laser speckle contrast analysis (Hecht et al., 2009)	S-LSCI	N.D	5 x 7 mm ² à 8 x 12 cm ²	4.5 mm	25
Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow in humans during neurosurgery: a pilot clinical study (Parthasarathy et al., 2010)	S-LSCI	5 ms	2 x 1 cm ²	2.5 mm	70 à 100
Laser speckle imaging identification of increases in cortical microcirculatory blood flow induced by motor activity during awake craniotomy (Klijn et al., 2013)	S-LSCI	20 ms	~ cm ²	~ mm	25
Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke (Woitzik et al., 2013)	S-LSCI	4 ms	18 x 24 cm ²	1 mm	25
Reliability of laser speckle flow imaging for intraoperative monitoring of cerebral blood flow during cerebrovascular surgery: comparison with cerebral blood flow measurement by single photon emission computed tomography (Nomura et al., 2014)	S-LSCI	16 ms	~ cm ²	~ mm	30
Intraoperative laser speckle contrast imaging with retrospective motion correction for quantitative assessment of cerebral blood flow (Richards et al., 2014)	S-LSCI	5 ms	2 x 1.5 cm ²	9.9 μm	100
Infarct prediction by intraoperative laser speckle imaging in patients with malignant hemispheric stroke (Hecht et al., 2016)	S-LSCI	8.4 ms	18 x 24 cm ²	1 mm	25
Intraoperative multi-exposure speckle imaging of cerebral blood flow (Richards et al., 2017)	MESI	0.5 à 20 ms	2 x 1.5 cm ²	4.9 μm	75

Tableau II.3. Tableau récapitulatif des études cliniques en imagerie speckle pour l'évaluation du CBF. (N.D: Non Disponible)

CONCLUSION: ENJEUX POUR L'APPLICATION DE L'IMAGERIE SPECKLE MULTI-EXPOSITION EN CLINIQUE

Plusieurs techniques existent en préclinique pour l'étude de la microcirculation sanguine, telles que l'OCT, la TPLSM, la fUS, la LDF et l'imagerie speckle LSCI. Néanmoins, l'imagerie speckle se démarque des autres techniques par son instrumentation peu coûteuse, sa portabilité et sa capacité d'acquérir des images en champ large, sans traceur, sans contact avec des résolutions spatiale (dizaines de micromètres) et temporelle (de l'ordre des millisecondes) adaptées à l'échelle des variations hémodynamiques. L'imagerie speckle a déjà été implémentée dans des dispositifs commerciaux sous sa variante S-LSCI. Dans cette thèse, nous avons développé une approche d'imagerie optique à haute résolution spatiotemporelle par LSCI, plus particulièrement la variante MESI. Les raisons pour lesquelles nous nous sommes appuyés sur cette technique sont les avantages que MESI apporte par rapport à la technique S-LSCI, plus particulièrement la meilleure quantification du débit sanguin en présence de diffuseurs statiques, comme c'est le cas dans les études *in vivo*. Aujourd'hui, les contraintes qui empêchent l'utilisation de la technique MESI en clinique sont, en premier lieu la complexité de son instrumentation et, en second lieu le traitement d'images chronophage qui limite son application en temps-réel. À cet effet, nous proposons (i) une simplification de l'instrumentation du montage MESI traditionnel (Chapitre III) et (ii) une approche par réseau de neurones en remplacement du modèle d'ajustement non-linéaire pour le traitement rapide des images (Chapitre IV). Le but est de pouvoir extraire les cartes de débit sanguin dans un laps de temps compatible avec une utilisation clinique en temps-réel. Dans le but ultime de l'implémentation de l'approche MESI en clinique, nous avons validé notre montage simplifié pour le MESI sur un modèle animal (Chapitre V). Nous avons choisi l'activation du cortex somatosensoriel en tonneaux chez la souris comme modèle animal car il s'agit d'un modèle accessible pour une manipulation *in vivo* et adéquat pour l'étude du couplage neurovasculaire et de la variation du débit sanguin cérébral par imagerie speckle.

CHAPITRE III. DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME D'IMAGERIE SPECKLE SYNTHÉTIQUE À EXPOSITION MULTIPLE

Introduction	44
1 Bases théoriques et méthodologiques de l'imagerie speckle dynamique	45
1.1 Fondements théoriques de l'imagerie speckle dynamique	45
1.2 Imagerie speckle à exposition multiple	47
1.3 Variation des modèles d'autocorrélation en fonction du régime de diffusion	50
1.4 Choix de l'approche de calcul du contraste speckle	51
1.5 Choix du ou des temps d'exposition	54
1.6 Choix du grandissement optique et de l'ouverture numérique	56
1.6.1 <i>Étude de l'influence de l'échantillonnage spatial des grains de speckle par le détecteur</i>	56
1.6.2 <i>Influence de la taille du filtre spatial</i>	58
1.6.3 <i>Effet de la profondeur de champ sur le contraste speckle</i>	59
1.6.4 <i>Évaluation expérimentale des paramètres optimaux de grandissement et d'ouverture numérique</i>	61
2 MESI en exposition synthétique versus exposition modulée	62
2.1 Dispositif d'imagerie MESI en exposition modulée	63
2.2 Instrumentation pour l'acquisition MESI en exposition synthétique	65
2.3 Calcul du contraste speckle MESI pour les deux approches	65
2.4 Prises en compte des bruits en imagerie MESI modulée et synthétique	66
2.4.1 <i>Expression du rapport signal sur bruit pour une caméra CMOS</i>	67
2.4.2 <i>Autres sources de bruit liées à l'architecture de la caméra</i>	67
2.4.3 <i>Importance relative des bruits en MESI pour les deux implémentations</i>	69
3 Validation <i>in vitro</i> de l'approche MESI par exposition synthétique	72
3.1 Système microfluidique à débit et pression contrôlés	72
3.2 Caractérisation expérimentale des contributions des bruits au contraste speckle dans les deux approches MESI	74
3.3 Contribution relative du bruit de grenaille au contraste speckle en MESI synthétique selon les conditions d'imagerie	76
3.4 Effet de la durée inter-images sur l'évaluation du contraste speckle en exposition synthétique	79
3.5 Comparaison directe de la quantification relative du débit par expositions modulée et synthétique	80
4 Effet du mouvement sur l'évaluation du contraste speckle en exposition synthétique	81
4.1 Présentation du montage pour l'évaluation de l'effet des mouvements	82
4.2 Approche d'évaluation du biais lié aux mouvements latéraux	83
4.3 Etude du biais lié aux mouvements en z	85
Conclusion	87

INTRODUCTION

La diffusion dynamique de la lumière (DLS pour « Dynamic Light Scattering ») est l'étude des fluctuations d'intensité de la lumière cohérente diffusée par un milieu. Cette technique trouve des applications dans différents domaines scientifiques dans lesquelles des propriétés bien précises des molécules peuvent être investiguées. En 1868, John Tyndall a été l'un des premiers à analyser la taille de particules dans une suspension colloïdale en exposant un échantillon à un laser dont la longueur d'onde était plus petite que la taille des particules en suspension. Un peu plus tard, Lord Rayleigh a montré l'importance de l'indice de réfraction dans l'étude de la diffusion de la lumière. La DLS a été formulée pour la première fois en 1871 par Strutt et al. (Strutt et al., 1871). La technique peut être utilisée pour estimer la taille des particules, mesurer les concentrations de molécules et étudier les cinétiques chimiques. En 1908, la théorie de Mie a été énoncée. Cette théorie a rendu possible l'étude de la diffusion de la lumière en prenant en compte différents paramètres tels que la taille et l'absorbance des particules, la longueur d'onde utilisée et l'indice de réfraction (pour revue sur les applications de la DLS, Stetefeld et al., 2016). La diffusion de la lumière par les globules rouges en mouvement est à la base de la mesure du débit sanguin. L'interaction entre une lumière cohérente et des particules en mouvement induit des fluctuations temporelles dans l'intensité rétrodiffusée causées par le « décalage Doppler ». L'imagerie speckle se sert de ces fluctuations pour mesurer indirectement le débit sanguin.

Dans une première partie de ce chapitre, nous détaillerons brièvement les fondements théoriques et les bases méthodologiques de l'imagerie speckle dynamique en particulier les relations permettant d'établir le lien entre le contraste speckle et la vitesse des diffuseurs mobiles. Nous présenterons les limites des modèles initiaux de l'implémentation en simple exposition qui ont conduit à l'approche multi-exposition que nous avons adoptée et dont nous détaillerons le modèle. Des points méthodologiques essentiels, à savoir, les différentes approches pour le calcul du contraste local, le choix du temps d'exposition et les effets des paramètres optiques du système sur la mesure du contraste speckle seront aussi détaillés. Dans une seconde partie, nous présenterons la comparaison expérimentale de deux approches instrumentales que nous avons développées pour le MESI: l'imagerie modulée et l'imagerie synthétique. Nous détaillerons les montages réalisés ainsi que leurs mises en œuvre sur des puces microfluidiques. Nous présenterons ensuite les différentes composantes du bruit et les approches pour les corriger dans les deux méthodes d'acquisition. Dans la troisième partie, nous comparerons expérimentalement les approches synthétique et modulée *in vitro* sur un système microfluidique représentatif de la microcirculation sanguine *in vivo*. Nous montrerons que l'imagerie synthétique permet de mesurer quantitativement les variations relatives de débit. Nous concluons ce chapitre en présentant les résultats expérimentaux obtenus pour évaluer l'impact et les biais éventuels introduits par les mouvements globaux de l'objet étudié sur l'évaluation du contraste speckle.

1 BASES THÉORIQUES ET MÉTHODOLOGIQUES DE L'IMAGERIE SPECKLE DYNAMIQUE

Cette section concerne les fondements théoriques de l'imagerie speckle à simple exposition (S-LSCI) et multi-exposition (MESI). Les approches de calcul du contraste speckle local seront présentées ainsi que le choix de différents paramètres instrumentaux et expérimentaux qui requièrent une attention particulière.

1.1 FONDEMENTS THÉORIQUES DE L'IMAGERIE SPECKLE DYNAMIQUE

Une figure de speckle est visible lors de la diffusion des ondes d'un faisceau de lumière cohérente par un objet de surface irrégulière à l'échelle de la longueur d'onde ou présentant des hétérogénéités d'indice optique. Ce motif, appelé tavelure en français, est composé de tâches ou grains aléatoirement sombres et brillants correspondants à des interférences plus ou moins constructives et destructives. À la suite du développement des lasers, la théorie statistique initiale de ce phénomène a été établie par Goodman dès 1975 (Goodman, 1975). En particulier, l'amplitude du speckle résulte d'une marche au hasard dans le plan complexe, la phase est alors répartie de façon équiprobable entre 0 et 2π et la densité de probabilité des intensités suit une loi exponentielle décroissante. Dans ces hypothèses, le contraste local de la figure de speckle enregistré par une caméra acquiert différentes valeurs entre 0 et 1. Dans le cas d'absence de variation temporelle de l'objet illuminé, les grains de speckle restent figés au cours du temps et lorsque le speckle est pleinement développé le contraste atteint sa valeur maximale de 1. Lorsque l'objet varie au cours du temps, en particulier lorsqu'il contient des diffuseurs en mouvement, la figure de speckle se modifie à un rythme dépendant de la vitesse de mouvement des diffuseurs, et on parle de « speckle bouillonnant ». Ceci induit une diminution du contraste de la figure de speckle observée. La diminution du contraste correspond à un flou local dans l'image dû au fait que le temps d'exposition de la caméra T est long comparé au temps de décorrélation des diffuseurs τ_c . En effet, plus les diffuseurs mobiles bougent rapidement, plus les grains de speckle sont modifiés rapidement durant le temps d'acquisition de l'image, et plus la valeur du contraste speckle va s'approcher de sa valeur minimale (Goodman, 1975).

Au cours des années 90, le domaine de l'imagerie speckle dynamique du débit sanguin s'est développé sur une base théorique appropriée qui relie de façon semi-quantitative le contraste local d'une image de speckle à la vitesse locale des globules rouges en mouvements. Dans ce paragraphe nous en fournissons un aperçu théorique succinct nécessaire pour dériver la relation entre le contraste speckle et le temps de décorrélation des diffuseurs τ_c .

Le contraste speckle K , mesure du degré de flou local, permet une quantification indirecte du mouvement des diffuseurs. Il est défini comme le rapport de l'écart-type σ à l'intensité moyenne $\langle I \rangle$ du motif de speckle évalué localement (Briers, 1996):

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} \quad (\text{Équation III.1})$$

En 1981, Fercher et Briers ont proposé la relation suivante qui relie le contraste speckle K à l'autocovariance des fluctuations d'intensité temporelles $C_t(\tau)$:

$$K^2 = \frac{\sigma^2(T)}{\langle I \rangle^2} = \frac{1}{T \langle I \rangle^2} \int_0^T C_t(\tau) d\tau \quad (\text{Équation III.2})$$

$$\text{où } C_t(\tau) = \langle [I(t) - \langle I \rangle_t][I(t + \tau) - \langle I \rangle_t] \rangle_t \quad (\text{Équation III.3})$$

Plus tard, Bandyopadhyay et al. 2005 ont introduit une version mathématique plus rigoureuse de l'Équation III.2:

$$K^2 = \frac{\sigma^2(T)}{\langle I \rangle^2} = \frac{2}{T \langle I \rangle^2} = \int_0^T (1 - \frac{\tau}{T}) C_t(\tau) d\tau \quad (\text{Équation III.4})$$

La dérivation de la relation entre le contraste speckle K et le temps de décorrélation τ_c s'appuie sur les équations des fonctions d'autocorrélation temporelle du champ électrique $E(t)$ et de l'intensité $I(t)$, notées respectivement $g_1(\tau)$ et $g_2(\tau)$. L'autocorrélation temporelle du champ électrique $g_1(\tau)$ est définie comme suit:

$$g_1(\tau) = \frac{\langle E^*(t)E(t+\tau) \rangle}{\langle E^*(t)E(t) \rangle} \quad (\text{Équation III.5})$$

L'autocorrélation temporelle de l'intensité $g_2(\tau)$ s'écrit:

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle_t^2} = 1 + \frac{C_t(\tau)}{\langle I \rangle_t^2} \quad (\text{Équation III.6})$$

Une relation entre $g_1(\tau)$ et $g_2(\tau)$ a été établie et elle est connue sous le nom de la relation de Siegert:

$$g_2(\tau) = 1 + |g_1(\tau)|^2 \quad (\text{Équation III.7})$$

En pratique, le facteur β est introduit dans la relation de Siegert afin de prendre en compte la perte de contraste due à l'inadéquation entre la taille d'un pixel et celle d'un grain de speckle, à la polarisation de lumière et à la cohérence limitée de la source laser. La relation de Siegert modifiée s'écrit:

$$g_2(\tau) = 1 + \beta |g_1(\tau)|^2 \quad (\text{Équation III.8})$$

En se basant sur les Équations III.2 et III.8, la première relation reliant le contraste speckle K au temps de décorrélation τ_c a été dérivée (Fercher et al., 1981):

$$K(T, \tau) = \frac{\sqrt{1 - e^{-2x}}}{c} \quad \text{où } x = \frac{T}{\tau_c} \quad (\text{Équation III.9})$$

Ce modèle initial suppose que $g_1(\tau)$ est une exponentielle négative de la forme

$$g_1(\tau) = e^{-y} \quad (\text{Équation III.10})$$

avec $y = \frac{x}{\tau_c}$. Cette forme de $g_1(\tau)$ correspond à une diffusion simple des photons des diffuseurs en mouvement brownien. Le profil de vitesse des diffuseurs dans ce cas est lorentzien. D'autres formes mathématiques de $g_1(\tau)$ ont été proposées, correspondant à d'autres conditions de diffusion et de mouvement des diffuseurs. Elles seront discutées dans la section III.1.3.

En se basant sur les Équations III.4, III.8 et III.10, une relation plus rigoureuse entre K et τ_c a été établie où le factor correctif β est pris en compte:

$$K(T, \tau_c) = \sqrt{\beta \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2}} \quad (\text{Équation III.11})$$

Ainsi, il est possible d'évaluer τ_c en se basant sur des valeurs connues et/ou mesurables de K , de T et de β .

Lorsque T est significativement supérieur à τ_c , une approximation asymptotique peut être utilisée (Tom et al., 2008). Dans ce cas, la relation entre le contraste speckle K , le temps d'exposition T et le temps de décorrélation τ_c est décrite par:

$$\tau_c = T \cdot K^2 \quad (\text{Équation III.12})$$

La relation exacte entre la vitesse absolue des diffuseurs et τ_c n'est pas connue. Il a été établi expérimentalement qu'il existe un rapport de proportionnalité entre la vitesse moyenne des particules et le temps de décorrélation des particules. Néanmoins, le coefficient de proportionnalité dépend du nombre de particules en mouvement qui interagissent avec la lumière, de leur vitesses réelles, de leurs formes et de leur orientation, qui restent des inconnues inaccessibles expérimentalement *in vivo* (Briers, 1996). La LSCI permet donc d'obtenir des mesures de la vitesse relative moyenne des diffuseurs en supposant que cette vitesse est inversement proportionnelle à τ_c , à une constante près. En général, un indice de débit sanguin (BFI pour « Blood Flow Index » ou ICT pour « Inverse (de)Correlation Time ») est utilisé comme métrique relative inversement proportionnel à τ_c .

1.2 IMAGERIE SPECKLE À EXPOSITION MULTIPLE

Le modèle décrit au paragraphe précédent, repose sur une hypothèse essentielle, celle d'un signal entièrement issu de diffuseurs mobiles. Cette condition est cependant rarement réalisée en conditions réelles, où la figure de speckle est composée de la superposition d'une figure dynamique (due à la diffusion sur les globules rouges en mouvement) et d'une figure statique (due à la lumière diffusée par les tissus conjonctifs, la peau et les os). En termes d'imagerie, ces deux composantes présentent un comportement fondamentalement différent en fonction du temps d'exposition. À intensité détectée constante, le contraste statique reste constant alors que le contraste dynamique diminue avec le temps d'exposition. Afin de distinguer la contribution des diffuseurs statiques, l'imagerie speckle à exposition multiple MESI a été développée sur la base d'un nouveau modèle

mathématique incorporant les contributions statiques et dynamiques à la figure de contraste (Parthasarathy et al., 2008). Ce modèle est résumé ci-dessous.

En présence de diffuseurs fixes, le champ électrique possède une contribution statique induisant la déviation de la variation de son intensité des statistiques gaussiennes. Pour prendre ceci en compte, le champ électrique peut être modélisé comme suit (Boas et al., 1997):

$$E(t) = E_f(t) + E_s e^{i2\pi f_0 t} \quad (\text{Équation III.13})$$

où $E_f(t)$ représente la fluctuation gaussienne du champ électrique, E_s est l'amplitude du champ statique et f_0 la fréquence de la source lumineuse.

La relation de Siegert en présence de diffuseurs uniquement mobiles, déjà mentionnée, se réécrit alors en présence d'une contribution statique (Lemieux et al., 1999):

$$g_2(\tau) = 1 + A\beta |g_1(\tau)|^2 + B\beta |g_1(\tau)| \quad (\text{Équation III.14})$$

où $A = \frac{I_f^2}{(I_f + I_s)^2}$, $B = \frac{2 I_f I_s}{(I_f + I_s)^2}$, sachant que $I_f = \langle E_f \cdot E_f^* \rangle$ représente la proportion de lumière diffusée dynamiquement et $I_s = \langle E_s \cdot E_s^* \rangle$ représente la proportion de lumière diffusée statiquement.

La quantité de signal détectée dans un pixel S_i de la caméra est proportionnelle au nombre total de photons reçus par ce pixel pour un temps d'exposition T donné. En d'autres termes, S_i est proportionnelle à la moyenne temporelle de l'intensité du pixel $I_i(t)$:

$$S_{i,T} = \int_0^T I_i(t) dt / T \quad (\text{Équation III.15})$$

Par suite, la variance temporelle de l'intensité du pixel $I_i(t)$ s'écrit:

$$S^2 = \iint_0^T I_i(t) I_i(t + \tau) dt d(t + \tau) / T^2 \quad (\text{Équation III.16})$$

En faisant appel à la relation de Siegert $\langle I(t)I(t + \tau) \rangle = g_2(\tau) \langle I \rangle^2$, et sachant que $g_2(\tau)$ est une fonction paire, nous en tirons l'équation:

$$\langle I^2 \rangle_T = \langle I \rangle^2 \int_0^T g_2(\tau) d\tau / T^2 \quad (\text{Équation III.17})$$

En combinant les Équations III.14 et III.17 nous en déduisons:

$$\langle I^2 \rangle_T = \langle I \rangle^2 \int_0^T [1 + A\beta |g_1(\tau)|^2 + B\beta |g_1(\tau)|] d\tau / T^2 \quad (\text{Équation III.18})$$

Par suite, le contraste speckle peut s'exprimer comme (Dixon et al., 2003):

$$K^2 = A\beta \int_0^T 2 \left(1 - \frac{t}{T}\right) g_1^2(t) \frac{dt}{T} + B\beta \int_0^T 2 \left(1 - \frac{t}{T}\right) g_1(t) \frac{dt}{T} \quad (\text{Équation III.19})$$

Pour des diffuseurs en mouvement brownien, l'équation précédente se simplifie en:

$$K(T, \tau_c) = \left\{ \beta \rho \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta \rho (1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x^{1/2}}{x^2} \right\} \quad (\text{Équation III.20})$$

où T est le temps d'exposition de la caméra, β est le facteur de correction constant qui tient compte des différents paramètres instrumentaux, ρ est défini comme le rapport de la contribution d'intensité des diffuseurs mobiles sur l'intensité totale des diffuseurs mobiles et statiques et $x = \frac{T}{\tau_c}$.

Néanmoins, le modèle précédent omet l'impact des bruits expérimentaux sur le contraste speckle. Le bruit d'acquisition lié à la caméra peut être classé principalement en trois sous-catégories: le bruit de grenaille, le bruit de lecture et le bruit d'obscurité (« shot noise », « readout noise » et « dark noise » respectivement). À ces bruits s'ajoute également d'autres sources potentielles de biais dans l'estimation du contraste comme les fluctuations de l'illumination laser, la contribution de la lumière ambiante et les mouvements globaux de l'objet. L'impact individuel de chaque bruit est discuté ultérieurement (section III.3.2). En combinant la contribution des différents bruits dans la variable u_{noise} , le modèle mathématique complet de contraste de speckle dynamique en MESI s'écrit (Parthasarathy et al., 2008):

$$K(T, \tau_c) = \left\{ \beta \rho^2 \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta\rho(1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^2} + u_{\text{noise}} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Équation III.21})$$

Pratiquement, en MESI, des images de speckle brutes sont acquises à différents temps d'exposition de la caméra. Ces images sont ensuite traitées pour extraire les images de contraste speckle pour les temps d'exposition choisis. Enfin, le modèle mathématique de l'Équation III.21 est ajusté sur les données de contraste en fonction du temps d'exposition pour extraire le temps de décorrélation τ_c . L'approche MESI a démontré une bien meilleure linéarité de la variation des temps de décorrélation avec le débit sanguin comparativement à la mesure simple exposition S-LSCI pour les études *in vivo* en présence de diffuseurs statiques (Parthasarathy et al., 2008; Soleimanzad, 2018). La supériorité du MESI est d'autant plus sensible que les débits sont élevés. La Figure III.1.A montre la variation relative du τ_c en fonction du changement relatif du débit dans un canal microfluidique de 100 μm de diamètre mesuré par MESI et par S-LSCI à deux temps d'exposition différents. Ce résultat montre la non-linéarité de la relation entre τ_c et les débits relatifs pour une analyse sur le modèle speckle à exposition unique. Cette linéarité est recouverte lorsque l'approche MESI est utilisée. L'absence de termes de bruit et de prise en compte de la contribution des diffuseurs statiques dans le modèle S-LSCI conduit à une estimation incorrecte du τ_c pour un temps d'exposition donné contrairement à l'approche MESI. La Figure III.1.B montre l'évolution du contraste speckle en fonction du temps d'exposition pour différentes vitesses des diffuseurs mobiles (de 0 à 7 mm/s par incrément de 1 mm/s). Le modèle MESI s'adapte très bien aux données expérimentales pour toutes les vitesses d'écoulement.

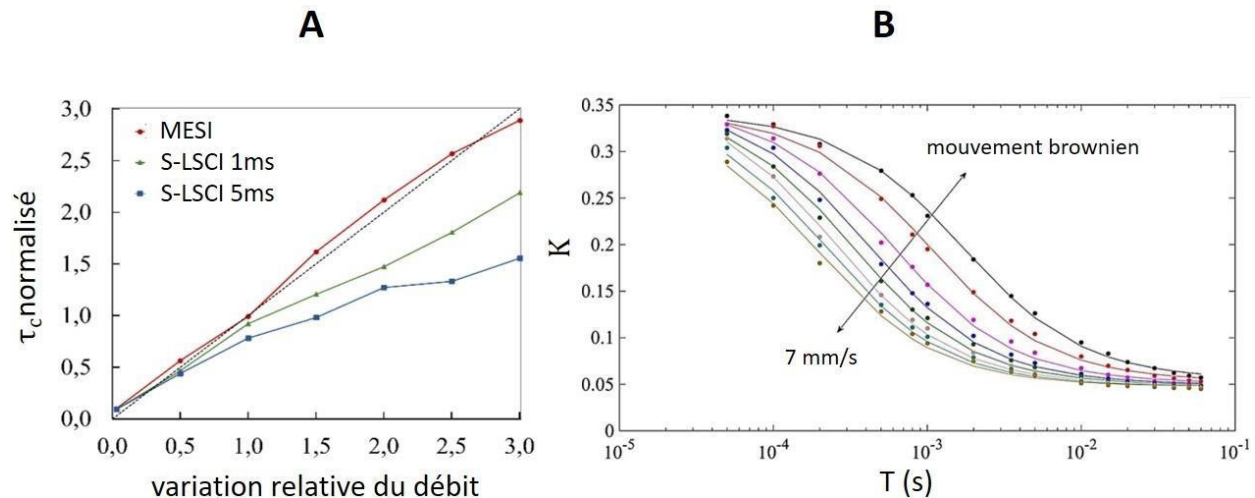


Figure III.1. La technique MESI permet une meilleure estimation de τ_c . (A) Variations de τ_c normalisé en fonction du débit normalisé en S-LSCI (à 1 et 5 ms) et en MESI. La normalisation a été effectuée par rapport au τ_c obtenu pour un débit de $1 \mu\text{l}/\text{min}$. (B) Ajustement du contraste speckle expérimental au modèle MESI (Équation III.21) pour différentes vitesses d'écoulement. (Adaptée de Soleimanzad, 2018)

1.3 VARIATION DES MODÈLES D'AUTOCORRÉLATION EN FONCTION DU RÉGIME DE DIFFUSION

Dans les modèles d'ajustement non-linéaire présentés dans la section précédente, le profil de vitesse des diffuseurs mobiles correspond à un mouvement brownien. Historiquement, le mouvement des diffuseurs mobiles est considéré comme proche du mouvement brownien décrit par une distribution lorentzienne des vitesses (Fercher et al., 1981; Duncan et al., 2008a; Briers et al., 2013). Néanmoins, dans la circulation sanguine, une hypothèse *a priori* raisonnable est que le mouvement des diffuseurs peut être aussi ordonné, au moins dans certains vaisseaux. Dans les artérioles, une distribution gaussienne des vitesses a été suggérée (Bandyopadhyay et al., 2005). L'hypothèse formulée sur la nature du mouvement a des conséquences sur les bases théoriques de l'imagerie speckle car l'expression de $C_t(\tau)$, de K et donc la valeur estimée de τ_c dépendent du profil de vitesse des diffuseurs (Goodman, 1975; Fercher et al., 1981). Cette question a été largement débattue, et, il a été montré, que pour les études *in vivo*, où le contraste mesuré est inférieur à 0.4, le choix du modèle de distribution lorentzien ou gaussien a un faible impact sur la dérivation de τ_c (Boas et al., 2010). À noter que, les fonctions $C_t(\tau)$ pour une distribution gaussienne ou lorentzienne des vitesses sont toutes deux valables dans l'approximation du régime à simple diffusion (Kazmi et al., 2015a).

Dans la plupart des études, l'hypothèse la plus courante reste donc celle d'un écoulement non ordonné et de la distribution lorentzienne des vitesses qui en découle. Cependant, cette hypothèse dépend strictement du régime de diffusion étudié. Des événements de diffusion multiples sont très probables dans l'imagerie du débit sanguin vu que: (i) le sang est de nature fortement diffusive, et (ii) la microvascularisation sous-jacente est très hétérogène et dense. Par conséquent, des tentatives

ont été faites pour tenir compte de la diffusion multiple dans la formation des motifs de speckle. Le Tableau III.1 résume les différents modèles proposés et la forme correspondante de $g_1(\tau)$. À noter que, dans le cas de diffusion multiple, une normalisation par N_d , facteur proportionnel au nombre d'événements de diffusion dynamique, difficile à estimer expérimentalement *in vivo*, est nécessaire (Boas et al., 1997). Ce tableau comparatif montre que les différents modèles de $g_1(\tau)$ et de régimes de diffusion dépendent de la nature des vaisseaux sanguins et de leur calibre. Ainsi en théorie, pour une estimation rigoureuse de τ_c , il serait nécessaire d'utiliser un modèle mathématique non-ubiquitaire, adapté à l'hétérogénéité de la microvascularisation sous-jacente, ajoutant une complexité de calcul à l'analyse des images pixel par pixel par ajustement non-linéaire.

Régime de diffusion	$g_1(\tau)$	Diamètre approximatif du vaisseau
Simple/Non ordonné	e^{-x}	$30 < \Phi < 110 \mu\text{m}$
Simple/Ordonné	e^{-x^2}	$\Phi > 110 \mu\text{m}$
Multiple/Non ordonné	$e^{-N_d\sqrt{x}}$	$\Phi < 30 \mu\text{m}$
Multiple/Ordonné	e^{-N_dx}	$30 < \Phi < 110 \mu\text{m}$

Tableau III.1. Tableau résumant les différents régimes de diffusion dans différents calibres de vaisseaux sanguin et les fonctions d'autocorrélation du champ $g_1(\tau)$ associées. (Données basées sur Bandyopadhyay et al., 2005; Boas et al., 1997; Fercher et al., 1981; Liu et al., 2021; Zakharov et al., 2009)

1.4 CHOIX DE L'APPROCHE DE CALCUL DU CONTRASTE SPECKLE

En pratique, différentes approches ont été proposées pour le calcul des images de contraste speckle: le calcul du contraste spatial K_s , le calcul du contraste temporel K_t ou une combinaison des deux, le calcul du contraste spatiotemporel K_{st} .

Le calcul du contraste spatial a été proposé initialement en 1996 (Briers, 1996). Cette approche, la plus courante, repose sur le calcul du contraste local sur une seule image de speckle brute en utilisant un filtre glissant carré de pixels adjacents. Le filtre glissant utilisé est souvent de taille 3×3 (Humeau-Heurtier et al., 2013), 5×5 (Dunn et al., 2001) ou 7×7 pixels (Cheng et al., 2003). Tous les pixels de la fenêtre sont utilisés pour calculer l'intensité moyenne locale $\langle I_s(x, y) \rangle$, l'écart-type des intensités locales $\sigma_s(x, y)$ et le contraste speckle local $K_s(x, y)$ résultant attribué au pixel central de la fenêtre dans la nouvelle image du contraste:

$$K_s(x, y) = \frac{\sigma_s(x, y)}{\langle I_s(x, y) \rangle} \quad (\text{Équation III.22})$$

Le filtre est ensuite glissé sur l'image pour calculer, de proche en proche, une image du contraste à partir de l'image de speckle brute. La Figure III.2.A montre le principe de calcul de K_s . Les pixels en rose correspondent aux pixels pour lesquels le calcul du contraste est approché en raison de leur localisation aux bords de l'image brute. Il existe plusieurs façons pour remédier à ce problème. L'une des solutions possibles est le « padding » qui consiste à ajouter des pixels autour de l'image

d'origine pour pouvoir effectuer des calculs aux niveaux des bords. Les options sont multiples parmi lesquelles: le « padding » par des zéros (ajout de zéros à la périphérie de l'image), le « padding » par répllication (copie des pixels du bord de l'image pour remplir les pixels ajoutés) et le « padding » par symétrie (réflexion des pixels de l'image par rapport aux bords) parmi d'autres. L'estimation de K_s sur les bords est affectée par le type de « padding » utilisé. Le contraste speckle est calculé à partir des grandeurs statistiques (moyenne et écart-type) des intensités locales. Par conséquent, plus le filtre est étendu en nombre de pixels, plus le nombre de valeurs prises en compte est important et meilleure est leur estimation statistique. Cependant, l'augmentation de la dimension du filtre spatial dégrade la résolution spatiale des images de contraste. Un compromis doit donc être fait entre la précision statistique et la résolution spatiale. Un filtre de grande dimension peut être utilisé pour l'étude de larges régions homogènes ou lorsque la résolution spatiale n'est pas un paramètre crucial.

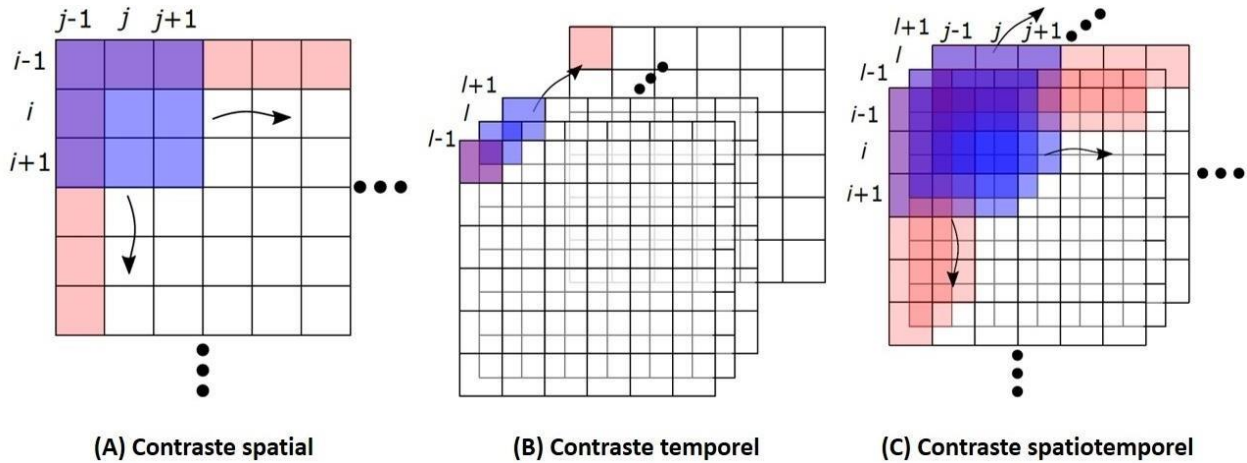


Figure III.2. Illustration des différentes approches de calcul du contraste speckle. Le filtre glissant est représenté par des carrés bleus. Les carrés roses représentent les limites où le calcul du contraste nécessite un « padding ». Les flèches indiquent les directions de déplacement des filtres. (Adaptée de Vaz et al., 2016).

Une seconde approche, reposant sur le calcul du contraste temporel K_t , est illustrée sur la Figure III.2.B. Le calcul du contraste pour un pixel est fait le long de la dimension temporelle (Cheng et al., 2003). Les valeurs du même pixel sur N images successives sont utilisées pour calculer la moyenne des intensités successives du pixel $\langle I_t(x, y) \rangle$ et l'écart-type correspondant $\sigma_t(x, y)$. Le contraste temporel K_t pour ce pixel est alors calculé comme suit:

$$K_t(x, y) = \frac{\sigma_t(x, y)}{\langle I_t(x, y) \rangle} \quad (\text{Équation III.23})$$

Ce calcul est appliqué à tous les pixels de l'image brute. Cette approche améliore évidemment la résolution spatiale au détriment de la résolution temporelle. Celle-ci est limitée par le grand nombre d'images successives nécessaires pour le calcul du contraste (25 pour être équivalent à un filtre spatial 5 x 5). Des systèmes d'enregistrement à haute sensibilité et à grande vitesse ont été

proposés pour surmonter la limitation de la résolution temporelle (Sun et al., 2015; Hultman et al., 2018). Au-delà de l'amélioration de la résolution temporelle, K_t a montré une meilleure estimation du contraste speckle que K_s en présence de diffuseurs statiques (Parthasarathy et al., 2008; P. Li et al., 2013). Néanmoins, le calcul du K_t est peu utilisé car il peut être fortement biaisé par des incertitudes dues aux instabilités expérimentales temporelles telles que les bruits de la caméra, les fluctuations du laser ou les mouvements du sujet. Il nécessite également un très grand nombre d'images et réduit la possibilité de réaliser des études dynamiques avec une résolution temporelle adaptée aux phénomènes hémodynamiques.

Enfin, l'approche spatiotemporelle est un compromis entre les approches spatiales et temporelles (Duncan et al., 2008b). Dans cette approche, le filtre utilisé est généralement un parallélépipède de dimension (N_x, N_y, N_t) . La Figure III.2.C montre le calcul du contraste spatiotemporel K_{st} avec un élément cubique de $3 \times 3 \times 3$ pixels. Le filtre est déplacé dans les dimensions spatiales et temporelles des données. En général, les filtres utilisés sont anisotropes dans lesquelles les dimensions spatiales N_x et N_y sont égales et la dimension temporelle N_t est plus grande que les dimensions spatiales. L'effet des dimensions temporelle et spatiale du filtre a été étudié en détails sur des données simulées et des données *in vivo* obtenues sur le cerveau du rongeur. Des dimensions spatiales (N_x, N_y) de 3×3 et 9×9 pixels et une plage de dimension temporelle N_t de 3 à 30 pixels ont été testés. Ces mesures ont montrés que la valeur moyenne du contraste speckle K_{st} dépend à la fois de la dimension temporelle et de la dimension spatiale et que, pour les applications pratiques, des filtres de $3 \times 3 \times 15$ pixels (anisotropes) ou de $5 \times 5 \times 5$ pixels (isotropes) sont des choix pertinents (Qiu et al., 2010; Soleimanzad, 2018).

En résumé, l'approche temporelle privilégie la résolution spatiale tandis que l'approche spatiale privilégie la résolution temporelle. En LSCI les contrastes mesurés sont identiques par les deux approches uniquement dans l'hypothèse d'un champ imagé homogène dépourvu de diffuseurs statiques. Pour choisir entre les deux approches, il est utile de savoir quelle dimension est la plus importante à préserver au regard du phénomène étudié. Dans les études des changements hémodynamiques sur le cerveau du petit animal, la résolution spatiale minimale doit permettre d'étudier des vaisseaux sanguins de l'ordre de quelques dizaines de micromètres de diamètre, et la résolution temporelle requise pour étudier les changements du débit sanguin cérébral lors d'une activation cérébrale doit être de l'ordre des centaines de millisecondes. La Figure III.3 montre un exemple de données *in vivo* obtenues au cours de la thèse pour lesquelles le contraste a été calculé selon les trois méthodes.

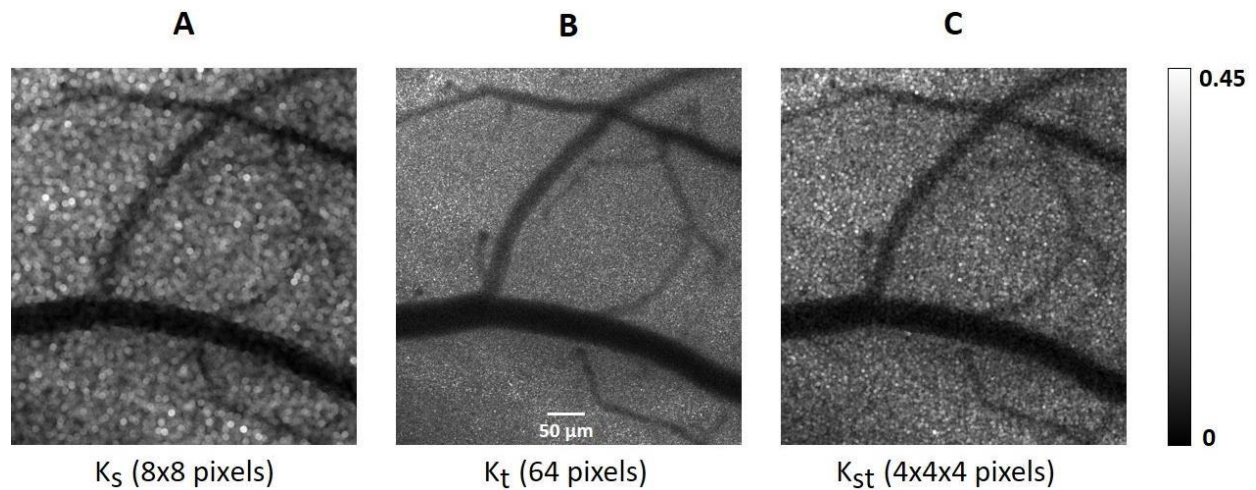


Figure III.3. Images *in vivo* obtenues au cours de la thèse du contraste speckle (à $T = 1$ ms) calculé par les différentes approches sur un nombre de pixels équivalent. (A) Contraste spatial. (B) Contraste temporel. (C) Contraste spatiotemporel.

Dans ce qui suit, nous adoptons un calcul du contraste speckle dans le domaine spatial avec une fenêtre de 5×5 pixels sauf indication contraire. Pour des raisons de simplification, ce contraste spatial sera noté par K .

1.5 CHOIX DU OU DES TEMPS D'EXPOSITION

Le temps d'exposition T de la caméra est un paramètre essentiel en LSCI. Comme nous le voyons sur la Figure III.4, à un temps d'exposition court, seuls les flux rapides dans les gros vaisseaux entraîneront un flou, sachant qu'un T long est plus sensible aux diffuseurs mobiles lents dans les capillaires (Yuan et al., 2005).

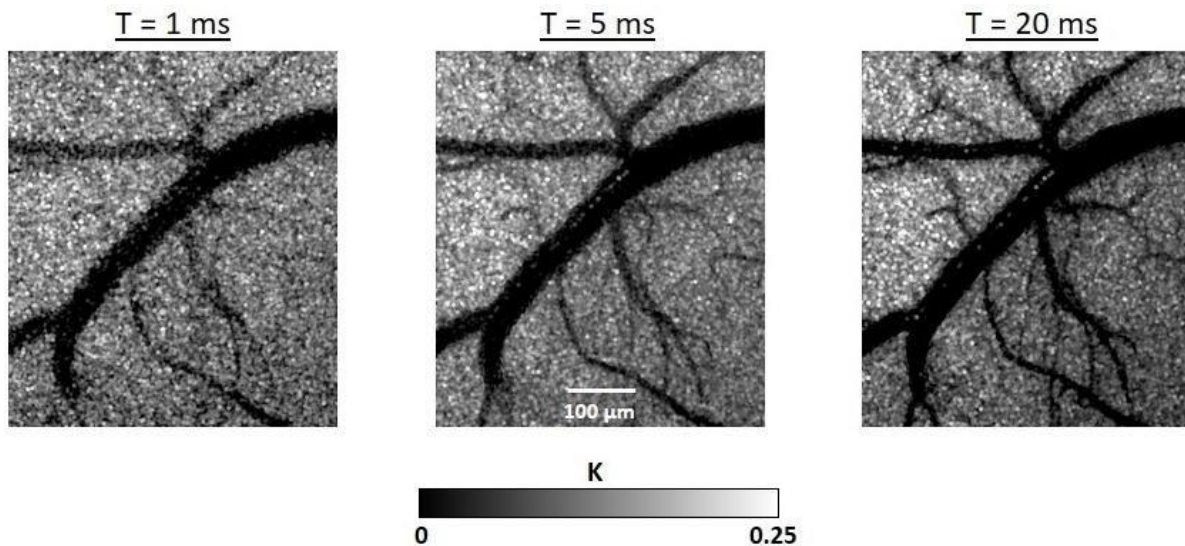


Figure III.4. Images du contraste speckle obtenues au cours de la thèse en imagerie MESI synthétique au niveau du cortex somatosensoriel de la souris pour différents temps d'exposition (1, 5 et 20 ms).

En pratique, le temps d'exposition le plus court est souvent limité par la sensibilité de la caméra et la puissance de la source lumineuse. L'usage est de se situer si possible légèrement en dessous de la limite de saturation de la caméra pour utiliser au mieux sa dynamique et maximiser le rapport signal sur bruit des images de speckle brutes. Par ailleurs, un temps d'exposition long est sensible aux mouvements lents mais aussi à l'accumulation des bruits expérimentaux. La sensibilité du contraste speckle à la vitesse du sang joue un rôle majeur dans l'obtention d'un rapport signal sur bruit élevé. La sensibilité absolue (S_a) et la sensibilité relative (S_r) de l'imagerie speckle ont été définies comme suit (Yuan et al., 2005):

$$S_a = \left| \frac{dK}{dV} \right| a \tau_c \frac{x}{2K} \left[\frac{1}{2x^2} - \frac{(2x+1)}{2x^2} e^{-2x} \right] \quad (\text{Équation III.23})$$

$$S_r = \left| \frac{\frac{dK}{K}}{\frac{dV}{V}} \right| = \frac{1}{2K^2} \left[\frac{1}{2x} - \frac{(2x+1)}{2x} e^{-2x} \right] \quad (\text{Équation III.24})$$

où K et V sont respectivement le contraste speckle et la vitesse des diffuseurs et $x = \frac{T}{\tau_c}$. La Figure III.5.A montre l'évolution théorique du contraste speckle en fonction de x en S-LSCI. Cette courbe montre que la sensibilité du contraste speckle relativement à la vitesse des diffuseurs est la plus significative entre les deux extrêmes du rapport x . La Figure III.5.B représente la variation de S_a en fonction de x . La sensibilité absolue atteint son maximum lorsque T est de l'ordre du τ_c . Ce pic de sensibilité absolue a été constaté pour des temps d'exposition de l'ordre de la milliseconde pour l'imagerie *in vivo* du débit sanguin dans le cerveau du rongeur, en accord avec les mesures directes des fonctions d'autocorrélations réalisées en imagerie ultrarapide (Postnov et al., 2020). Néanmoins, un temps d'exposition plus long reste nécessaire pour pouvoir visualiser clairement les petits vaisseaux où les valeurs du τ_c sont plus élevés (voir la Figure III.4 où les plus petits capillaires ne sont nettement visibles que sur l'image obtenue pour $T = 20$ ms). Finalement, la Figure III.5.C montre que S_r augmente avec le temps d'exposition puis se stabilise pour les temps d'exposition supérieurs à 2 ms. Autrement dit, la sensibilité relative aux modifications hémodynamiques mesurées par les variations du contraste speckle augmente rapidement, puis reste constante avec l'augmentation du temps d'exposition au-delà de 2 ms.

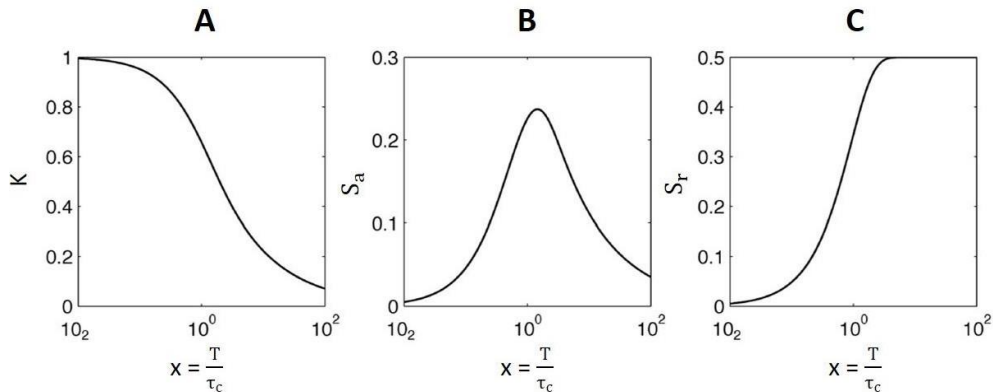


Figure III.5. Courbes théoriques du contraste speckle K , de la sensibilité absolue S_a et de la sensibilité relative S_r . (Adaptée de Yuan et al., 2005)

Des temps d'exposition de 1 à 50 ms sont généralement utilisés en LSCI pour évaluer les changements hémodynamiques *in vivo*. La littérature fait état de différents temps d'exposition utilisés pour l'imagerie S-LSCI compris entre 1 et 16 ms (Forrester et al., 2002; Dunn et al., 2005; Yuan et al., 2005; Varma et al., 2014). Les dispositifs cliniques commerciaux utilisent un temps d'exposition unique fixe qui peut aller jusqu'aux plusieurs dizaines de millisecondes (LSCI, Moor Instruments; Laser Speckle Contrast Analysis, Perimed; PerfusiX-Imaging, LIMIS).

En imagerie MESI, le choix des temps d'exposition est également le résultat d'un compromis. Le nombre de temps d'exposition et la rapidité de la caméra détermine la résolution temporelle avec laquelle les temps de décorrélation sont estimés. En effet, les images MESI sont acquises séquentiellement et à chaque groupe de différents temps d'exposition ne correspond qu'une seule estimation de τ_c . La qualité de l'estimation de τ_c par ajustement non-linéaire du modèle MESI sur les données dépend également du nombre et du choix des temps d'exposition. Il s'agit de bien échantillonner la décroissance de K avec T . Les implémentations MESI ont été réalisées en pratique pour des temps d'exposition compris entre 0.05 et 100 ms pour couvrir l'ensemble de la gamme des temps de décorrélation attendus. Des approches systématiques (Kazmi et al., 2014) ou semi-empirique (Soleimanzad, 2018) ont montré que six temps d'exposition autour de 0.05, 0.1, 1, 2, 5, 10 et 50 ms constituent un bon compromis.

1.6 CHOIX DU GRANDISSEMENT OPTIQUE ET DE L'OUVERTURE NUMÉRIQUE

L'imagerie du contraste speckle dynamique repose sur le calcul du contraste local dérivé de grandeurs statistiques. Un aspect souvent négligé est celui de l'échantillonnage spatial et statistique des grains de speckle. Si en théorie la valeur du contraste speckle est comprise entre 0 et 1, en pratique les valeurs maximales mesurées sont nettement inférieures à 1 (généralement entre 0 et 0.3 *in vivo*). En effet, la mesure du contraste speckle dépend de plusieurs paramètres instrumentaux, tels que la taille des pixels de la caméra, l'ouverture numérique (ON) du système d'imagerie, le grandissement optique (G) ainsi que la taille du filtre spatial utilisé pour le calcul local du contraste. Nous avons évalué analytiquement et expérimentalement les effets de ces différents paramètres sur l'évaluation du contraste speckle.

1.6.1 ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE L'ÉCHANTILLONNAGE SPATIAL DES GRAINS DE SPECKLE PAR LE DÉTECTEUR

Les pixels carrés de la caméra (Orca-Flash 2.8 Hamamatsu) de notre système d'imagerie ont une dimension finie de 3.63 μm . Lorsque la taille de chaque grain de speckle, acquis via un système optique associé à une caméra, est inférieure à la taille d'un pixel de la caméra, il se produit un moyennage spatial des grains de speckle. En d'autres termes, si plus d'un grain est imagé par le même pixel, la valeur du contraste speckle est sous-évaluée. La taille du grain de speckle sur l'image acquise dépend de plusieurs autres paramètres instrumentaux tels que la longueur d'onde de la source λ et les composants optiques utilisés. En effet, la taille minimale théorique d'un grain de speckle qui peut être résolue par le système d'imagerie s'écrit:

$$d_{\text{speckle min}} = 1.2 (1 + G) \lambda f\# \quad (\text{Équation III.27})$$

$$\text{avec } f\# = \frac{f_{\text{entrée}}}{d_{\text{pupille_entrée}}} \text{ a } \frac{1}{2 \times \text{ON}}$$

où $d_{\text{speckle min}}$ est le diamètre minimal d'un grain de speckle, $f\#$ est le « f-number » du système d'imagerie défini comme le rapport de la distance focale ($f_{\text{entrée}}$) divisée par le diamètre de la pupille d'entrée ($d_{\text{pupille_entrée}}$) du système optique. Nous observons que, pour une longueur d'onde donnée, la taille d'un grain de speckle augmente en théorie avec l'augmentation de G et diminue pour une ON croissante (Figure III.6).

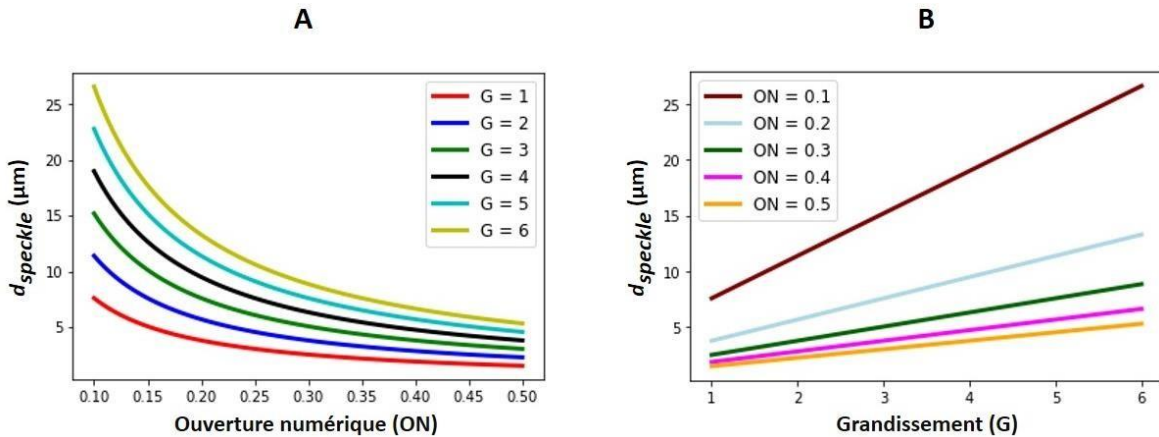


Figure III.6. Effets de l'ON et de G sur la taille d'un grain de speckle à 633 nm. (A) d_{speckle} en fonction de l'ON pour différents G . (B) d_{speckle} en fonction de G pour différentes ON.

La dimension du grain de speckle doit être au moins 2 fois plus grande que la taille du pixel de la caméra pour que le critère d'échantillonnage de Shannon-Nyquist soit satisfait dans le domaine spatial. En pratique, une valeur de 2 à 3 pixels par grains est préconisée (Kirkpatrick et al., 2008, Thompson et al., 2011). La Figure III.7 montre le rapport de la taille d'un grain de speckle à la taille du pixel de la caméra ($d_{\text{pixel}} = 3.63 \mu\text{m}$) en fonction de l'ON (Figure III.7.A) et de G (Figure III.7.B). Pour vérifier le critère d'échantillonnage de Shannon-Nyquist, un couple « ON- G » doit être choisi de sorte à être au-dessus de la ligne horizontale grise. En pratique, les valeurs d'ON et de G sont choisies en fonction des contraintes expérimentales: le champ de vue nécessaire détermine G et la nécessité d'utiliser au maximum la dynamique de la caméra peut influencer le choix de l'ON. Pour l'imagerie préclinique sur cerveau de souris, le champ de vue nécessaire est de l'ordre de $2 \times 3 \text{ mm}^2$ au maximum ce qui correspond à un grandissement autour de $\times 3$ sur notre système d'imagerie. Afin de rester dans le domaine d'échantillonnage spatial correct, la Figure III.7 montre qu'une ouverture numérique autour de 0.2 devrait être choisie, ce qui correspond à une dimension de grain de speckle de $7.6 \mu\text{m}$ et à un rapport $\frac{d_{\text{speckle}}}{d_{\text{pixel}}} = 2.1$.

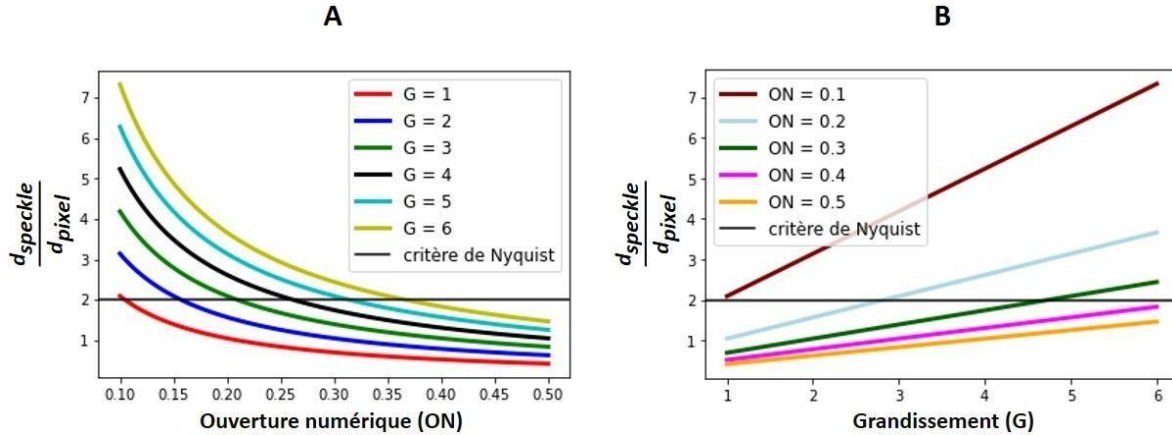


Figure III.7. Choix de l'ouverture numérique et du grandissement du système d'imagerie speckle en respect du critère de Shannon-Nyquist pour l'échantillonnage des grains de speckle par les pixels de la caméra.

1.6.2 INFLUENCE DE LA TAILLE DU FILTRE SPATIAL

La taille du filtre utilisé pour le calcul du contraste a un effet direct sur le contraste speckle mesuré. Il a été montré que le rapport de la taille du filtre (défini comme le nombre de pixels du côté du filtre glissant) sur la taille d'un grain de speckle en pixels doit être supérieur ou égal à 3.5 pour éviter un biais statistique sur K (Thompson et al., 2011). En effet, une taille de filtre suffisamment grande doit être choisie pour que l'échantillonnage statistique de la figure de speckle soit correct. Dans les faits, celle-ci est généralement rarement choisie au-delà de 5×5 ou 7×7 pixels pour maintenir une résolution spatiale adaptée à l'imagerie de la microcirculation. La Figure III.8 montre l'effet de la taille du filtre utilisé sur la mesure de K sur un standard de réflectance pour différents grandissements et ouvertures numériques mesuré à un temps d'exposition de 1 ms. Le contraste speckle augmente jusqu'à atteindre un plateau avec l'augmentation de la taille du filtre pour les différentes combinaisons d'ON et de G . Le plateau correspond à l'échantillonnage statistique correct. La Figure III.8.A montre que le contraste est maximal pour un G intermédiaire de $\times 3.3$. Pour ce grandissement et pour la taille de pixel de notre caméra, la Figure III.8.B montre que plus l'ON du système d'imagerie est élevée, plus le contraste augmente. Néanmoins, sur la Figure III.8.A nous voyons qu'un filtre de 5×5 associé au grandissement de $\times 3.3$ utilisé pour les expériences *in vivo* produit une diminution d'environ 10 % du contraste speckle par rapport à l'optimal. Bien que modeste, cette sous-estimation du contraste speckle entraîne une erreur dans l'estimation du temps de décorrélation τ_c et du débit sanguin associé. Cette réduction du contraste est prise en compte dans la variable β de l'ajustement non-linéaire (Équation III.21) et peut être corrigée empiriquement par calibration de la mesure du contraste speckle maximal atteignable avec le système (Parthasarathy et al., 2008, Qiu et al., 2013).

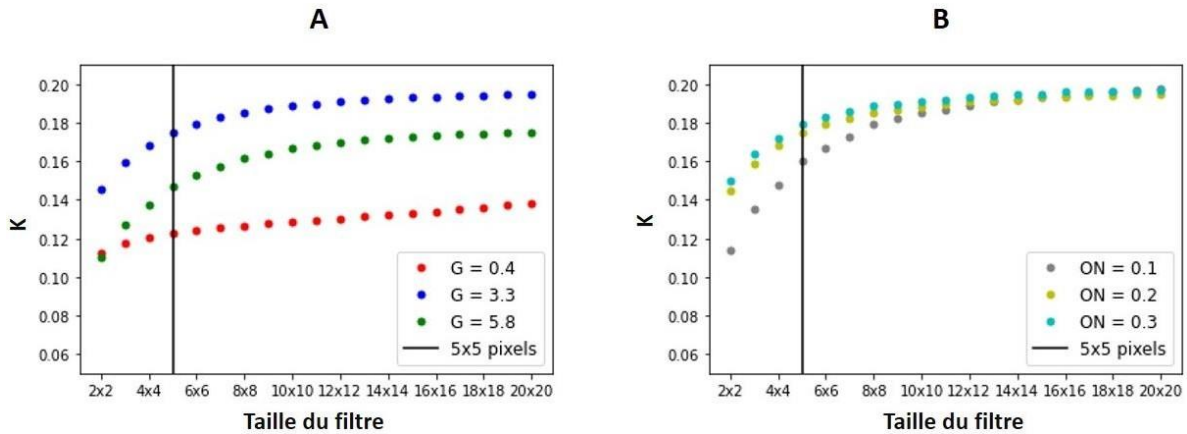


Figure III.8. Effet de la taille du filtre spatial utilisé sur la mesure du contraste speckle. (A) Effet du grandissement optique (mesures avec ON = 0.2). (B) Effet de l'ouverture numérique (mesures avec G = 3.3). Le trait noir vertical indique la taille de filtre choisie dans notre dispositif (5 x 5 pixels).

1.6.3 EFFET DE LA PROFONDEUR DE CHAMP SUR LE CONTRASTE SPECKLE

La profondeur de champ est la plage de distance dans laquelle l'objet imagé apparaît nettement. Le choix de l'ON et du G affecte la profondeur de champ du système d'imagerie. La profondeur de champ totale s'écrit:

$$d_{\text{champ}} = \frac{\lambda n}{\text{ON}^2} + \frac{n}{G \cdot \text{ON}} e \quad (\text{Équation III.28})$$

où d_{champ} représente la profondeur de champ, λ est la longueur d'onde de la source lumineuse et n est l'indice de réfraction du milieu. La variable « e » est la plus petite distance qui peut être résolue par un détecteur placé dans le plan image de l'objectif du microscope, dont le grandissement latéral est G. Nous avons évalué la profondeur de champ de notre système pour différentes valeurs d'ON et de G. La Figure III.9 résume la méthode que nous avons suivie pour mesurer la profondeur de champ avec la mire (Edmund Optics #1485) illuminée à 633 nm sur une large surface et sous un angle d'incidence de 45°. Pour chaque couple « ON-G » nous avons mesuré la profondeur de champ associée. Après acquisition de l'image, nous soustrayons de l'image acquise l'image moyenne correspondante (calculée avec un filtre moyen de 5 x 5 pixels). Ensuite, une ROI (pour « Region of Interest » ou région d'intérêt) en rouge est placée sur la zone des traits de sorte à couvrir tous les traits nets et un certain nombre de traits hors de la zone nette (Figure III.9.B). Un exemple de profil d'intensité en niveaux de gris le long de la direction horizontale de la ROI est tracé sur la Figure III.9.C. Pour calculer les valeurs de la d_{champ} , nous commençons par détecter les pics sur le profil. Sachant que chaque pic correspond à un trait sur la mire, et que la largeur d'un trait est de 70 μm , la distance minimale entre 2 traits successifs doit être au moins égale à $\frac{70 \cdot G}{3.63}$ où 3.63 μm correspond à la taille d'un pixel. Après avoir détecté les différents pics, nous effectuons un seuillage pour trier les pics et garder seulement ceux qui tombent dans la zone nette de l'image. Empiriquement, nous avons choisi de garder les pics dont

l'amplitude est strictement supérieure à 1/6 de l'amplitude maximale (pic central). À titre d'exemple, sur la Figure III.9.C, les pics retenus sont indiqués par des points rouges. En utilisant l'échelle prédéfinie de la mire (15 traits/mm), nous déduisons une estimation de la profondeur de champ à partir du nombre de pics retenus.

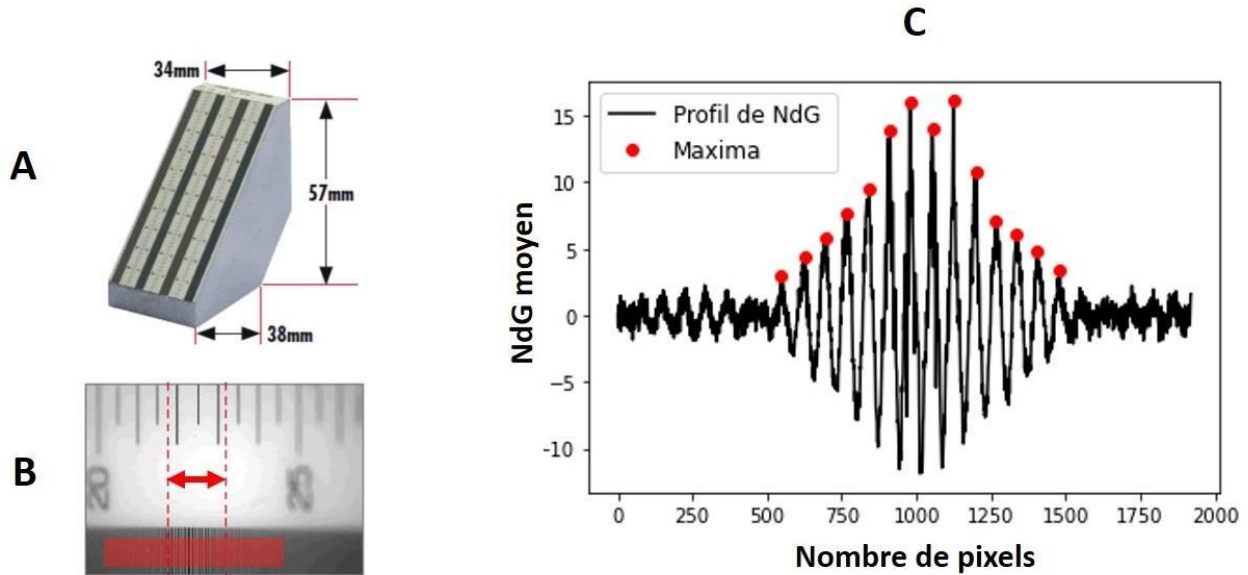


Figure III.9. Mesure de la profondeur de champ à l'aide de la mire Edmund. (A) Photo de la mire Edmund avec ses dimensions. (B) Image de la mire avec le modèle de ROI (rectangle rouge) utilisée pour la mesure du profil de niveaux de gris (NdG). La flèche rouge correspond à la profondeur de champ. (C) Exemple de profil de NdG moyen avec les pics retenus pour le calcul de la d_{champ} .

La Figure III.10 montre la variation de la profondeur de champ en fonction du grandissement (Figure III.10.A) et de l'ouverture numérique (Figure III.10.B). Ces mesures sont en accord avec le modèle mathématique (Équation III.28) qui prévoit une décroissance de d_{champ} avec l'augmentation du G et de l'ON. L'impact de la profondeur de champ sur le contraste speckle est difficile à estimer théoriquement d'autant qu'il est indissociable des effets parfois opposés de ON et G vus aux paragraphes précédents. Dans les sections suivantes, nous avons exploré expérimentalement l'influence de ces paramètres sur le contraste speckle pour notre système d'imagerie.

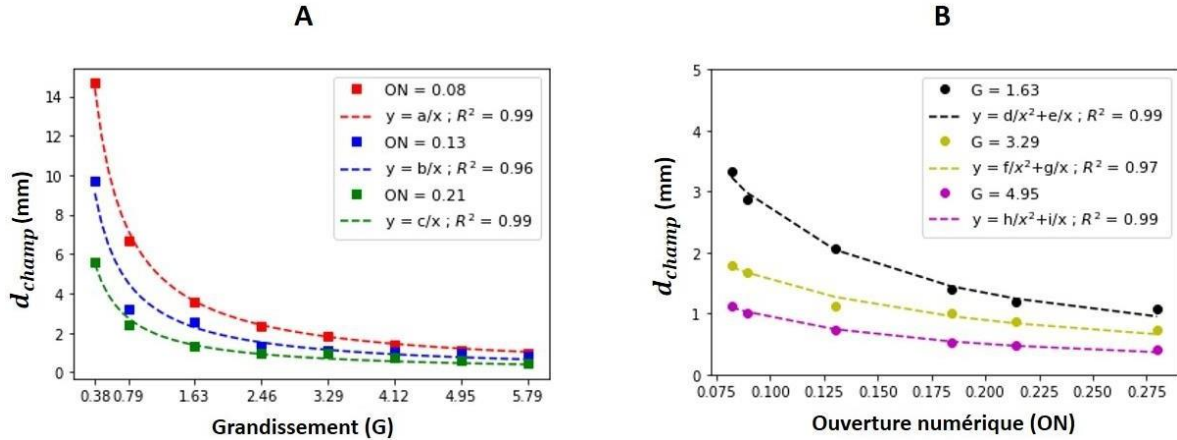


Figure III.10. Variation de la profondeur de champ en fonction de G et de l'ON. (A) d_{champ} en fonction de G pour différentes ON. (B) d_{champ} en fonction de l'ON pour différents G.

1.6.4 ÉVALUATION EXPÉRIMENTALE DES PARAMÈTRES OPTIMAUX DE GRANDISSEMENT ET D'OUVERTURE NUMÉRIQUE

Afin de prendre en compte les différents effets instrumentaux et méthodologiques sur la mesure du contraste speckle, nous avons étudié expérimentalement sur notre système optique et pour une caméra donnée (pixel de $3.63 \mu\text{m}$) l'effet de l'ouverture numérique et du grandissement (et donc indirectement de la profondeur de champ) sur le contraste mesuré K . Le système d'imagerie permet un grandissement continu allant jusqu'à $\times 6$ et six options échelonnées pour l'ON allant de 0.08 à 0.28. Les mesures de contraste ont été faites sur un standard de réflectance en Spectralon (99 % de réflectance allant de 250 à 2500 nm) à $T = 1$ ms avec une fenêtre de 5×5 pixels. Comme déjà mentionné, le choix pratique du grandissement dépend en premier lieu de la largeur du champ de vision voulu. Pour des applications *in vivo* sur cerveau de souris anesthésié, comme celle menées au Chapitre VI, un champ de vision de l'ordre de quelques mm^2 est requis et une valeur de $\times 3.3$ a été choisie. Nous avons vérifié expérimentalement l'impact de différentes valeurs de G sur l'évolution du contraste speckle en fonction de l'ON.

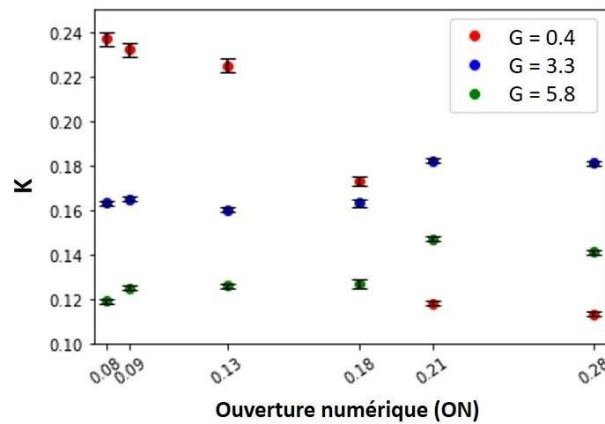


Figure III.11. Variation du contraste speckle en fonction de l'ouverture numérique pour différents grandissements. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types pour des mesures sur 10 ROI différentes.

Pour les grandissements de x3.3 et x5.8, ces données expérimentales montrent des valeurs du contraste relativement constantes quelle que soit l'ouverture numérique. À l'inverse, pour le grandissement le plus faible nous observons une diminution nette du contraste avec l'augmentation de l'ON. Les mêmes mesures de contraste ont été analysées pour le choix de l'ON. La Figure III.12 montre l'évolution du contraste speckle en fonction du G pour trois ouvertures numériques différentes. L'allure de l'évolution du contraste speckle en fonction de l'ON et du G est difficile à prévoir. Par exemple, pour une ON de 0.08, K augmente continuellement avec l'augmentation de G. À l'inverse, pour une ON de 0.21, K commence par augmenter, atteint un pic et diminue ensuite avec l'augmentation de G. Ces comportements complexes sont liés à l'interdépendance des paramètres qui vont affecter la mesure de K: les propriétés du système optique, en particulier sa réponse impulsionnelle en 3D mais également des effets superposés d'autres paramètres instrumentaux et méthodologiques (taille du filtre glissant, longueur d'onde utilisée, taille des pixels de la caméra). Ce point souligne la nécessité de réaliser pour un système optique et une caméra donnée une évaluation expérimentale et pas uniquement théorique pour le choix des paramètres G et ON. En pratique, nous avons choisi le couple « G = 3.3; ON = 0.21 » pour nos expériences *in vivo*, ce qui permet d'obtenir un champ de vue de 2 x 1.5 mm² pour la caméra utilisée.

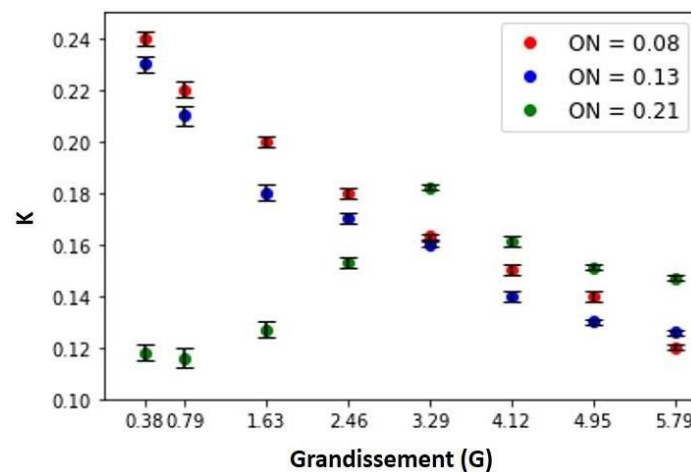


Figure III.12. Variation du contraste speckle en fonction du grandissement pour différentes ouvertures numériques. Les barres d'erreurs correspondent à des mesures sur 10 ROI différentes.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons comparé expérimentalement deux approches instrumentales du MESI: l'approche simplifiée à exposition synthétique et l'approche « standard » qui s'appuie sur la modulation de la lumière laser en durée et en amplitude.

2 MESI EN EXPOSITION SYNTHÉTIQUE VERSUS EXPOSITION MODULÉE

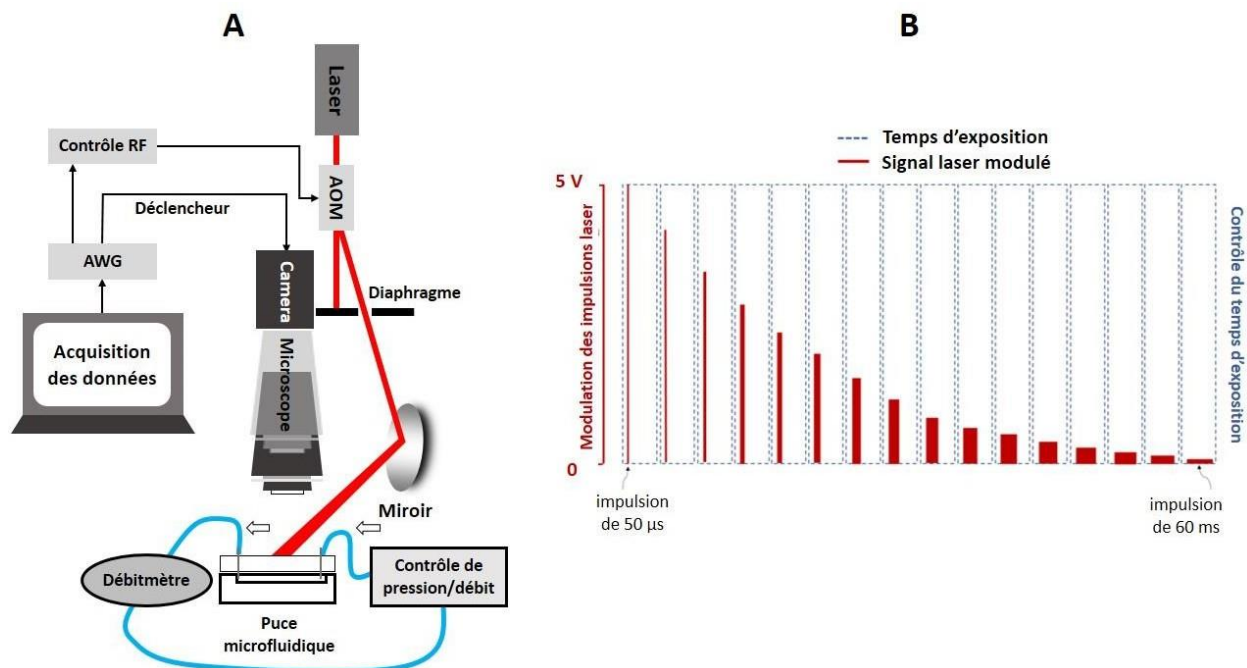
L'imagerie MESI consiste en une acquisition d'images de contraste speckle à différents temps d'exposition. L'approche traditionnelle du MESI, à exposition modulée, s'appuie sur un temps d'exposition constant de la caméra T associé à des impulsions de laser modulées simultanément en intensité et en durée. De cette manière, le bruit de la caméra peut être maintenu constant et, en

modulant de manière appropriée l'intensité du laser, le nombre moyen de photons détectés et, par conséquent, le bruit de grenaille reste constant. La modulation est réalisée par un modulateur acousto-optique (AOM pour « Acousto-Optic Modulator ») associé à un générateur de fonctions arbitraires pour obtenir une séquence d'impulsions lumineuses de durée croissante et d'intensité décroissante. Cette approche a été utilisée avec succès par plusieurs groupes, y compris le nôtre, au cours de la dernière décennie pour produire la plupart des ensembles de données MESI *in vivo* chez le petit animal (Parthasarathy et al., 2008, 2010; Kazmi et al., 2014; Richards et al., 2015; Soleimanzad et al., 2019, 2020). Néanmoins, l'instrumentation nécessaire est relativement complexe ce qui est un des facteurs limitant l'utilisation clinique de l'approche MESI. Au cours de la thèse, nous avons évalué une approche MESI avec une instrumentation simplifiée, basée sur une illumination constante et une prise d'image rapide à un seul temps d'exposition. Les images de contraste à différents temps d'exposition sont obtenues synthétiquement par la sommation d'images acquises à un temps d'exposition court. Cette approche a été proposée précédemment en utilisant des détecteurs SPAD (« Single-Photon Avalanche Diode ») à haute sensibilité et haute cadence d'acquisition, mais au prix d'une résolution spatiale fortement dégradée (moins de quelques dizaines à quelques centaines de pixels sur le champ de vue) (Dragojević et al., 2018). D'autres études ont utilisé une exposition synthétique avec une instrumentation complexe développée spécifiquement et basée sur des capteurs sCMOS associés à une architecture FPGA (« Field-Programmable Gate Array ») à fréquence d'images élevée, mais aucune comparaison systématique sur un même montage expérimental avec la méthode de modulation laser n'a été effectuée à titre de validation (Hultman et al., 2018; Sun et al., 2015). Dans ce contexte, nous avons comparé l'approche de l'exposition synthétique à l'approche de l'exposition modulée. Nous présentons dans cette section du chapitre l'instrumentation des deux approches MESI et l'analyse des bruits pouvant biaiser l'estimation du contraste. Les deux approches seront ensuite comparées *in vitro* dans la section 3 du chapitre pour en démontrer la faisabilité et discuter l'intérêt et les limites de l'approche MESI en exposition synthétique.

2.1 DISPOSITIF D'IMAGERIE MESI EN EXPOSITION MODULÉE

Nous avons développé un système MESI traditionnel à exposition modulée. Son architecture est illustrée sur la Figure III.13.A. L'acquisition des images se fait avec une caméra sCMOS de génération I (Orca-Flash 2.8, Hamamatsu, Massy, France) d'une sensibilité spectrale modeste (Efficacité quantique EQ = 42 % à 633 nm). Le capteur comporte 1920 x 1440 pixels carrés de 3.63 μm . La fréquence d'acquisition est de 46 images/s en champ complet. Cette caméra, refroidie à 5°C, possède des bruits relativement faibles: bruit de lecture de 3 électrons et bruit d'obscurité moyen de 11 électrons. La caméra peut fonctionner dans différents modes de déclenchement de sortie/d'entrée, tels que le déclenchement de lecture synchrone pour contrôler le temps d'exposition de chaque image à partir d'un signal TTL externe. La caméra est associée à un stéréomicroscope (Leica MZ16FA; objectif macroscopique; distance de travail de 6 cm) avec un grandissement réglable qui peut aller jusqu'à x6 et six options d'ouverture numérique allant de 0.08 à 0.28. La source lumineuse est une diode laser modulée en durée et en intensité ($\lambda = 633 \text{ nm}$, 200 mW, SGL,

Shanghai, Chine). La modulation rapide du laser est obtenue à l'aide d'un modulateur acousto-optique (AOM MTS110-A3-VIS, AA Optoelectronics, Orsay, France). Il est composé d'un cristal de TeO_2 avec deux ouvertures transparentes à travers lesquelles le faisceau laser peut passer. L'AOM est piloté par une onde radiofréquence (RF) qui est transmise au dispositif par l'intermédiaire de transducteurs piézoélectriques fixés au cristal. Ceci produit une onde de pression dans le dispositif, qui génère un réseau de diffraction de phase. En modulant l'amplitude de l'onde RF, l'intensité du premier ordre de diffraction peut être ajustée avec précision. Le signal de modulation est généré par un générateur d'ondes arbitraires ou AWG pour « Arbitrary Waveform Generator » (AWG, 2-Channels, Keysight series 33600A, Malaysia). La tension de modulation est une séquence basse fréquence de signaux rectangulaires variables, définissant le temps d'exposition et chaque amplitude déterminant l'intensité de la lumière diffractée dans le premier ordre de diffraction. Un diaphragme est utilisé pour filtrer la lumière non diffractée (ordre « zéro »). Le premier ordre de diffraction est dirigé vers l'échantillon à l'aide d'un miroir. La Figure III.13.B montre les signaux de commande du temps d'exposition de la caméra et de la modulation du laser par l'AOM générées par l'AWG, pour une séquence MESI de 16 temps d'exposition. Les lignes rouges pleines correspondent au signal de commande utilisé pour piloter l'AOM. La largeur de chaque impulsion est réglée en fonction du temps d'exposition souhaité, tandis que son amplitude est réglée de manière à égaliser la puissance (autrement dit, la quantité de photons) des différentes impulsions. Le signal de commande de l'AOM est synchronisé avec le deuxième canal de l'AWG qui génère le signal de commande pour déclencher l'exposition de la caméra.



bleues en pointillés sont les signaux de commande pour l'exposition de la caméra. Les deux signaux sont émis sur les deux canaux de l'AWG et synchronisés dans le temps.

2.2 INSTRUMENTATION POUR L'ACQUISITION MESI EN EXPOSITION SYNTHÉTIQUE

Le montage MESI à exposition synthétique utilise la même caméra sCMOS (Orca-Flash 2.8) montée sur le stéréomicroscope. La source lumineuse est identique au montage MESI par modulation laser (Figure III.14). Dans cette implémentation, les composants nécessaires pour la génération des signaux de modulation de la lumière laser et du temps d'exposition (AOM, AWG et contrôle RF) ne sont plus nécessaires. Les images de contraste sont générées à l'aide d'expositions synthétiques.

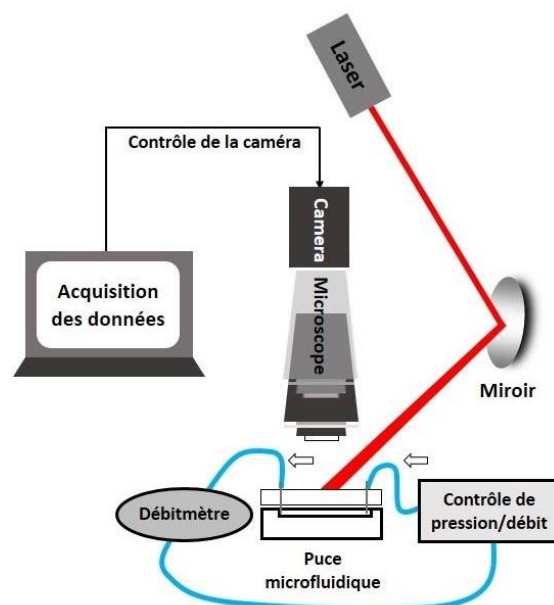


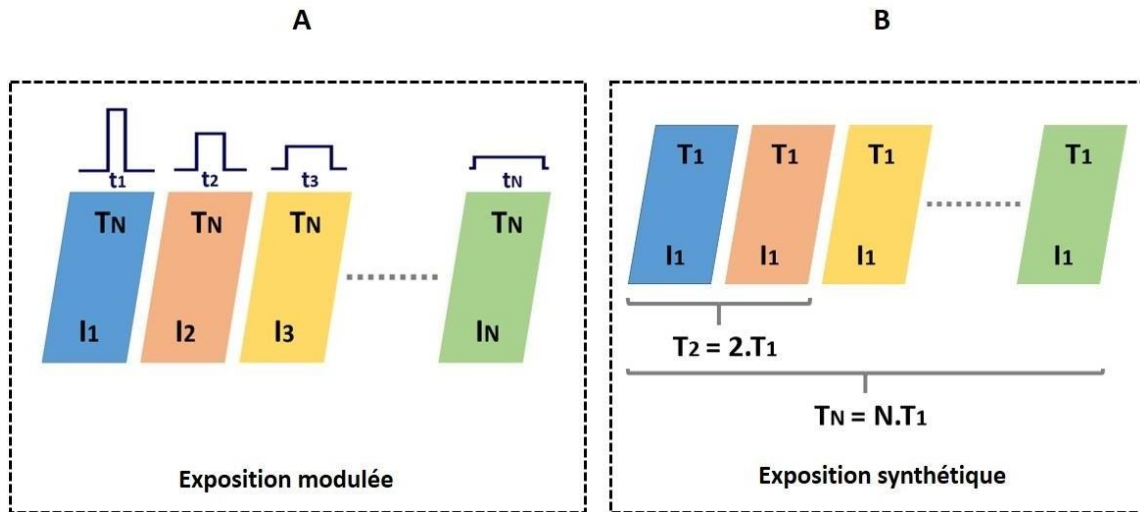
Figure III.14. Montage de l'imagerie MESI à exposition synthétique.

L'acquisition d'images et l'analyse des données de speckle brutes pour les deux approches MESI sont faites à l'aide de scripts écrits sous Micromanager et ImageJ respectivement. Afin de réduire le bruit dû aux fluctuations de la lumière ambiante, les expériences ont été réalisées en éclairage ambiant éteint. Pour chaque temps d'exposition, une seule image modulée et une seule image synthétique ont été respectivement utilisées pour calculer le contraste speckle.

2.3 CALCUL DU CONTRASTE SPECKLE MESI POUR LES DEUX APPROCHES

Pour la comparaison des deux approches MESI, les temps d'exposition utilisés sont $T = 1, 2, 5, 10, 15$ et 20 ms. Dans la première approche (exposition modulée), l'acquisition repose sur une exposition de la caméra fixée à 20 ms synchronisée à des impulsions laser variant en durée et en

intensité à l'aide de l'AOM. Les images de contraste K sont alors générées directement pour les différents temps d'exposition à partir de chacune des six images de speckle brut (Figure III.15.A). Dans la deuxième approche (exposition synthétique), les images de contraste sont générées à l'aide d'expositions synthétiques comme suit: le temps d'exposition de la caméra est fixé à 1 ms. Vingt images indépendantes à 1 ms sont acquises séquentiellement. Les images de speckle brutes pour $T = 1, 2, 5, 10, 15$ et 20 ms sont calculées comme la somme du nombre correspondant d'images à 1 ms (Figure III.15.B). Enfin, les images de contraste speckle sont obtenues à partir des images speckle brute sommées (« synthétiques »). Pour les deux approches, le contraste K est calculé en utilisant un filtre spatial de 5×5 pixels pour chaque temps d'exposition puis τ_c est dérivé par ajustement du modèle MESI (Équation III.21) aux données de contraste. En champ plein (1920×1440 pixels), la durée inter-images de la caméra Δ_i est fixée à environ 22 ms par l'électronique de vitesse de lecture de notre caméra (soit 46 images/s), ce qui limite la résolution temporelle entre chaque point d'évaluation de τ_c à 132 ms en imagerie modulée et 438 ms en imagerie synthétique.



2.4 PRISES EN COMPTE DES BRUITS EN IMAGERIE MESI MODULÉE ET SYNTHÉTIQUE

La contribution et la prise en compte des bruits instrumentaux sont sensiblement différentes dans les deux approches. Les bruits expérimentaux sont multiples. En premier lieu, le bruit d'acquisition regroupe le bruit statistique de grenaille ou « shot noise », le bruit d'obscurité ou « dark noise » et le bruit de lecture ou « readout noise ». Dans notre application d'imagerie utilisant une caméra CMOS dont chaque pixel dispose de son électronique propre, nous devons également considérer les non-uniformités tant du bruit de lecture et d'obscurité (FPN pour « Fixed Pattern Noise ») que

la non-uniformité de la conversion et amplification du signal de photons en électrons (PRNU pour « Photon Response Non Uniformity »). Enfin, d'autres facteurs sont susceptibles d'introduire une variabilité dans les signaux enregistrés à savoir les fluctuations de la source lumineuse en longueur d'onde et en intensité, la lumière ambiante éventuelle et la stabilité mécanique de l'objet étudié.

2.4.1 EXPRESSION DU RAPPORT SIGNAL SUR BRUIT POUR UNE CAMÉRA CMOS

Une expression simple du rapport signal sur bruit pour un pixel (ou SNR pour « signal to noise ratio ») d'une caméra d'architecture CMOS est donnée par:

$$\text{SNR} = \frac{\text{EQ}(\lambda).S.T}{\sqrt{\text{EQ}(\lambda).(S+I_a).T+\sigma_d^2+\sigma_r^2}} \quad (\text{Équation III.29})$$

Au numérateur de cette équation nous trouvons le signal d'intérêt disponible S en photons/pixel/s, l'efficacité quantique EQ de la caméra qui indique la probabilité qu'un photon à une certaine longueur d'onde soit converti en électron par le capteur et le temps d'exposition T . Au dénominateur, nous avons la racine carrée de la somme quadratique des différentes contributions de bruit. Le premier terme $(\text{EQ}(\lambda). (S + I_a). T)$ correspond au bruit de grenaille. Lorsque les photons d'une source d'intensité constante illuminent un pixel, le nombre de photons détectés varie statistiquement selon une loi de Poisson: l'écart-type sur le signal détecté est égal à la racine carrée du signal. Ainsi, la valeur absolue du bruit de grenaille augmente avec le signal détecté mais sa contribution relative diminue. Pour être rigoureux, ce terme comporte le signal utile S et la contribution du fond de lumière ambiante I_a qui doit être idéalement nulle. σ_d^2 correspond au bruit d'obscurité; c'est-à-dire le signal en électrons en absence de source lumineuse. Ce bruit est lié à l'agitation thermique des électrons dans un pixel de la caméra. Il dépend de la température (une augmentation de $+5^\circ\text{C}$ correspond à un doublement du bruit d'obscurité) et augmente avec le temps d'exposition. Le courant d'obscurité généré thermiquement suit une distribution de Poisson. Le bruit par pixel (en électrons) qui lui est associé varie donc comme la racine carrée du nombre d'électrons du courant d'obscurité dans ce pixel. σ_r^2 correspond au bruit de lecture du capteur. Cette fluctuation de bruit est ajoutée au signal lors de la lecture des charges collectées par le pixel (Reibel et al., 2003) et est considéré comme un bruit aléatoire. Il est causé par les fluctuations de tension dans les transistors de l'électronique de lecture du détecteur, ainsi que par le bruit thermique dans les composants électroniques qui composent le circuit de lecture. Pour une architecture donnée, plus la vitesse de lecture est élevée plus cette contribution de bruit augmente.

2.4.2 AUTRES SOURCES DE BRUIT LIÉES À L'ARCHITECTURE DE LA CAMÉRA

L'expression simple du SNR ci-dessus ne prend pas en compte plusieurs facteurs susceptibles d'affecter le calcul du contraste speckle K . La contribution de la lumière ambiante, potentiellement variable durant une acquisition, est facile à éliminer expérimentalement. Deux autres facteurs sont inhérents à l'architecture électronique des caméras CMOS. Le premier est la variabilité spatiale du bruit d'obscurité, appelé DSNU (« Dark Signal Non Uniformity »). En effet, le courant d'obscurité peut varier d'un pixel à l'autre dans une caméra CMOS. L'architecture électronique du capteur

induit un bruit de motif fixe (FPN). Il s'agit d'un bruit indépendant du signal, qui se manifeste par l'apparition de motifs ou de lignes fixes sur les images capturées. Plus le temps d'exposition de la caméra est élevé, plus le FPN lié au bruit est visible généralement sous forme de lignes verticales. La caméra que nous utilisons, Orca-Flash 2.8, possède des amplificateurs de lecture pour chaque pixel et chaque colonne. Grâce à l'optimisation du processus de fabrication, la différence de sortie entre ces amplificateurs est minimisée ce qui réduit très fortement le FPN par rapport à une caméra CMOS standard. Le second facteur est la variabilité de la réponse des pixels pour un niveau de lumière identique (PRNU). Ces non-uniformités sont également liées à l'hétérogénéité des pixels et à l'architecture de l'électronique et sont fixes au cours du temps, générant également un bruit de motif fixe (FPN). Les motifs FPN associés tant au DSNU qu'au PRNU sont spatialement reproductibles d'une image à l'autre, il est donc possible de s'en affranchir au moins partiellement sur les caméras sCMOS soit par des corrections directement à la sortie du capteur, soit par des algorithmes d'interpolations des pixels.

Lors de l'acquisition d'une image avec une caméra donnée, l'une ou l'autre des composantes de bruit domine selon la quantité de signal détecté, qui dépend à la fois de l'illumination et de la profondeur de puits des pixels (Figure III.16). Lorsque le niveau de signal détecté est faible, le bruit de lecture prédomine avec un niveau de bruit quasi-constant. Pour des niveaux de signaux intermédiaires, c'est le bruit de grenaille qui augmente selon la racine carrée du signal. Enfin, s'il n'est pas bien corrigé au niveau de l'architecture de la caméra, c'est le bruit fixe FPN qui s'impose. Au-delà du nombre maximal d'électrons permis par la profondeur de puits (ou « Full Well Capacity ») qui peut être stocké dans un pixel, nous observons la saturation du signal.

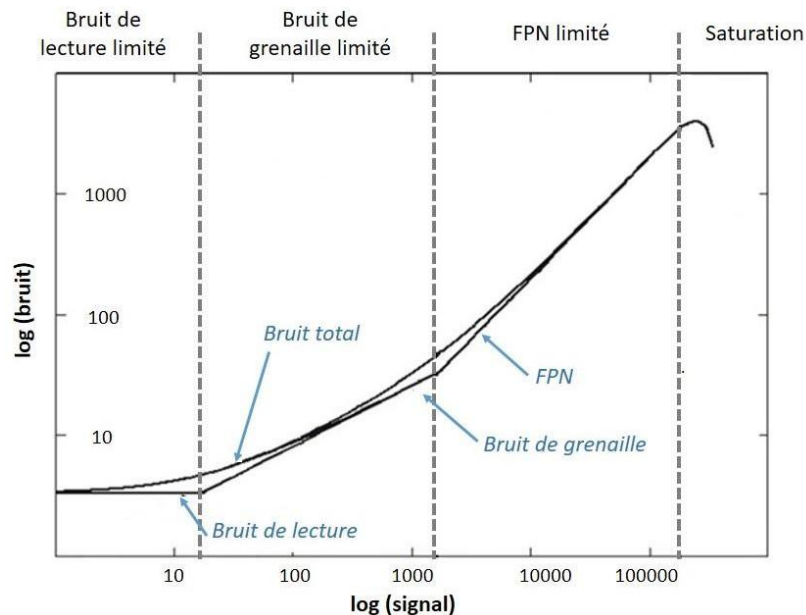


Figure III.16. Courbe typique bruit *versus* signal pour une caméra CMOS. Chaque composante de bruit domine successivement lorsque la quantité de signal disponible augmente. L'échelle log-log, permet

d'observer une pente de $\frac{1}{2}$ pour la zone de prédominance du bruit de grenaille et une pente de 1 pour la zone de prédominance du bruit FPN. (Adaptée de Crisp et al., 2020)

2.4.3 IMPORTANCE RELATIVE DES BRUITS EN MESI POUR LES DEUX IMPLÉMENTATIONS

En MESI, le calcul du contraste speckle fait intervenir l'écart-type local des intensités de pixels adjacents. Le contraste speckle est calculé à partir des propriétés statistiques (moyenne et écart-type) de l'intensité du signal local à l'aide de l'Équation III.22 et d'un filtre spatial de 5×5 pixels. En suivant cette méthode, pour une image de speckle sans aucune correction de bruits, l'intensité moyenne locale I_{raw} et l'écart-type σ_{raw} peuvent être calculés à partir des données brutes, ce qui conduit au contraste speckle brut:

$$K_{\text{raw}} = \frac{\sigma_{\text{raw}}}{\langle I_{\text{raw}} \rangle} \quad (\text{Équation III.30})$$

Cependant, comme détaillé dans les sections précédentes, plusieurs contributions de bruit du détecteur sont susceptibles de biaiser ce calcul. Pour la caméra utilisée (Orca-Flash 2.8), le bruit d'obscurité est de l'ordre de 11 électrons et le bruit de lecture est de 3 électrons en lecture du champ complet du capteur à 46 images/s. Quelle que soit l'implémentation instrumentale du MESI, l'intensité de l'illumination est ajustée pour utiliser au maximum la dynamique de la caméra dont les pixels possèdent une profondeur de puits de 18000 électrons, numérisés sur 12 bits soit 4096 niveaux de gris.

Pour l'implémentation « modulée » du MESI, à chaque temps d'exposition, une image de contraste est calculée à partir d'une seule acquisition d'une image de speckle brute. La modulation en intensité permet de maintenir le signal en limite de saturation et donc une contribution relative du bruit de grenaille constante et minimale pour tous les temps d'exposition. Cette contribution est facile à estimer et à soustraire à partir de l'intensité des signaux enregistrés à condition d'éliminer une éventuelle contribution de la lumière ambiante. Le bruit de lecture et le bruit d'obscurité restent également constants puisqu'une seule lecture d'une image d'une durée identique (20 ms) est réalisée quel que soit le « temps d'exposition » (fixé dans ce cas par la durée de l'impulsion laser). Par ailleurs, pour notre caméra et pour la durée d'acquisition d'une image en MESI modulée, ces deux composantes de bruit (« dark noise » et « readout noise ») sont *a priori* négligeables puisqu'une utilisation maximale de la dynamique de la caméra mène à la prédominance du bruit de grenaille. La contribution du FPN a été envisagée mais pour cette caméra sCMOS elle est faible à l'échelle d'une image aux temps d'exposition considérés (Figure III.17).

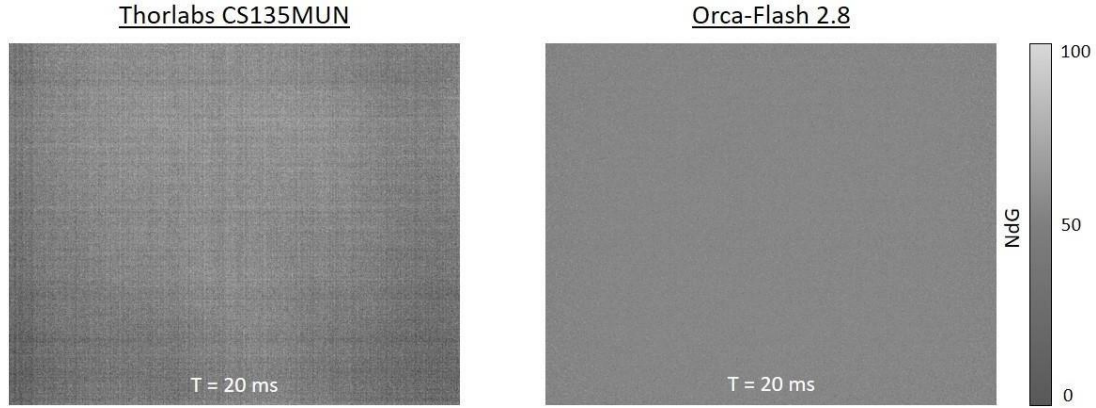


Figure III.17. Comparaison du FPN à $T = 20$ ms entre les caméras Thorlabs CS135MUN et la caméra Hamamatsu Orca-Flash 2.8 utilisée dans notre montage.

Pour l'imagerie MESI en synthétique, la contribution des bruits n'est plus constante et dépend du temps d'exposition puisque les images sont obtenues par sommation d'images acquises individuellement. Pour le bruit de grenaille, l'intensité maximale des images synthétiques n'est plus limitée par la profondeur des puits et nous nous attendons à une diminution continue de la contribution relative de ce bruit avec le temps d'exposition. Pour les bruits de lecture et d'obscurité, la construction d'images synthétiques par sommation d'images individuelle a pour résultat la somme des variances de chacun des bruits pour les images sommées. Il est donc essentiel de prendre ces bruits en compte.

Nous avons mis en œuvre une méthode de correction des bruits instrumentaux et expérimentaux inspirée d'une approche proposée dans un autre cadre pour des détecteurs simples pixels de type SPAD (Valdes et al., 2014). Nous évaluons séparément les contributions de bruit d'obscurité, de bruit de lecture et de bruit de grenaille pour obtenir le contraste speckle corrigé du bruit K_{corr} . Pour estimer simultanément les bruits d'obscurité et de lecture, une pile d'images à un temps d'exposition de 1 ms est acquise en absence d'illumination. À partir de ces images, nous évaluons l'intensité I_{dark} , la variance et l'écart-type σ_{dark} , et le contraste speckle résultant K_{dark} pour chaque temps d'exposition.

$$K_{\text{dark}} = \frac{\sigma_{\text{dark}}}{\langle I_{\text{dark}} \rangle} \quad (\text{Équation III.31})$$

Une image de l'intensité du bruit d'obscurité est soustraite de chaque image brute, ce qui conduit à I_{corr} , qui correspond aux intensités corrigées des intensités des bruits d'obscurité et de lecture. Ceci permet aussi une correction indirecte du FPN.

$$I_{\text{corr}} = I_{\text{raw}} - \langle I_{\text{dark}} \rangle \quad (\text{Équation III.32})$$

À partir de cette image résultante (I_{corr}), nous pouvons calculer la variance σ_{corr}^2 . Cependant, la contribution des fluctuations du bruit d'obscurité σ_{dark}^2 doit être soustraite de la variance σ_{corr}^2 . La contribution du bruit de grenaille obéit aux statistiques de Poisson avec une variance σ_{shot}^2

proportionnelle à la moyenne, ce qui se traduit par une contribution au contraste liée au bruit de grenaille calculée comme suit:

$$K_{\text{shot}} = \frac{1}{\sqrt{\gamma I_{\text{corr}}}} \quad \text{Équation III.33}$$

où γ est le rapport entre la capacité des puits du capteur et la gamme de NdG disponible (2^n avec n le nombre de bits de conversion analogique-numérique).

Enfin, le contraste speckle corrigé à la fois des bruits de grenaille, de lecture et d'obscurité s'écrit (Valdes et al., 2014):

$$K_{\text{corr}} = \sqrt{\frac{\sigma_{\text{corr}}^2 - \sigma_{\text{shot}}^2 - \sigma_{\text{dark}}^2}{\langle I_{\text{corr}} \rangle^2}} \quad \text{Équation III.34}$$

La Figure III.18 montre la caractérisation expérimentale des bruits d'obscurité et de lecture de la caméra Orca-Flash 2.8 utilisée en mode d'exposition simple (acquisition d'une seule image à un temps d'exposition donné de la caméra). Les bruits d'obscurité et de lecture sont faibles et homogènes pour tous les pixels (Figures III.18, A et B). De plus, ces bruits sont spatialement homogènes (Figure III.18.C) et temporellement invariants (Figure III.18.D), ce qui rend la soustraction de leur contribution au contraste speckle possible pour cette caméra en particulier.

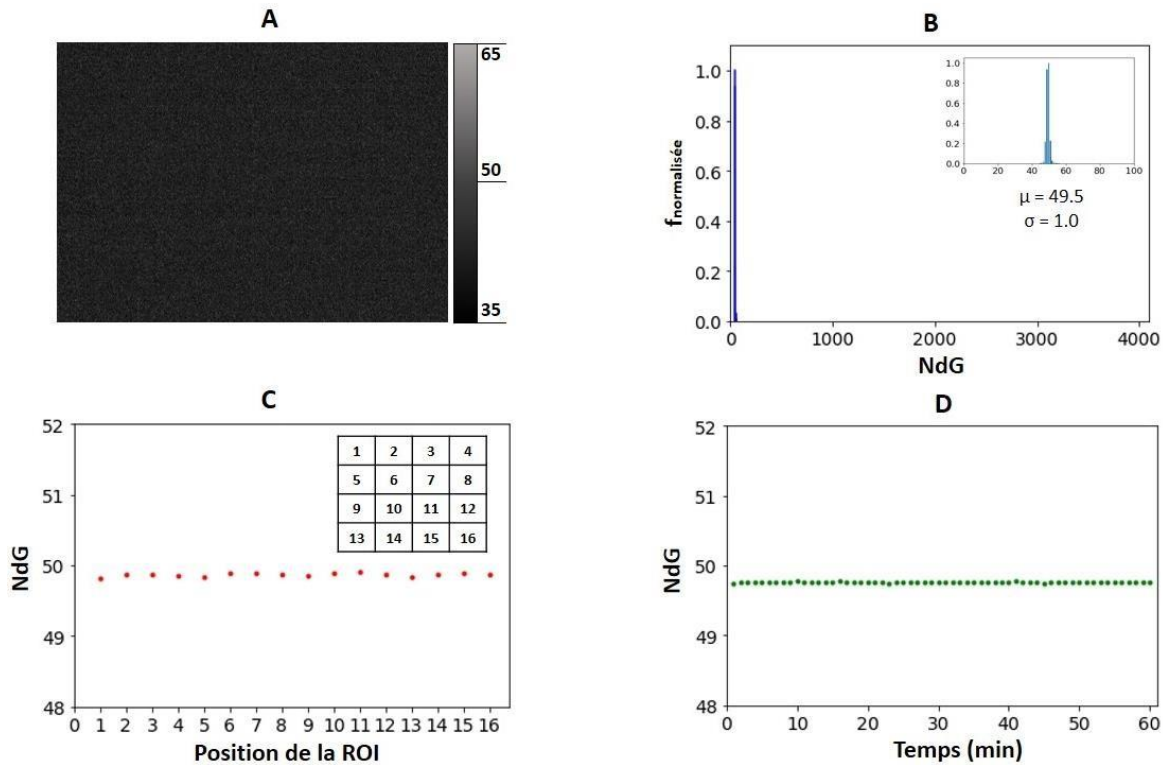


Figure III.18. Homogénéité et stabilité des bruits d'obscurité et de lecture de la caméra Orca-Flash 2.8. (A) Image représentative des bruits acquise en lumière éteinte pour $T = 1$ ms. (B) Histogramme correspondant des NdG. L'insert est un zoom sur les niveaux non nuls de l'histogramme. (C) Uniformité spatiale des bruits, le capteur a été divisé en 16 ROI de dimensions identiques numérotées de 1 à 16. (D) Stabilité temporelle des bruits évaluée comme le NdG moyen de toute l'image. (Chammas et al., 2022)

La Figure III.19 montre l'effet de la sommation des images d'un film acquis à $T = 1$ ms en absence de lumière pour l'évaluation du FPN en exposition synthétique. Nous voyons que plus le temps d'exposition est élevé, plus le FPN devient visible suite à la sommation des images. Ceci souligne l'importance d'une correction adéquate du bruit d'obscurité par soustraction d'images acquises en noir au même temps d'exposition.

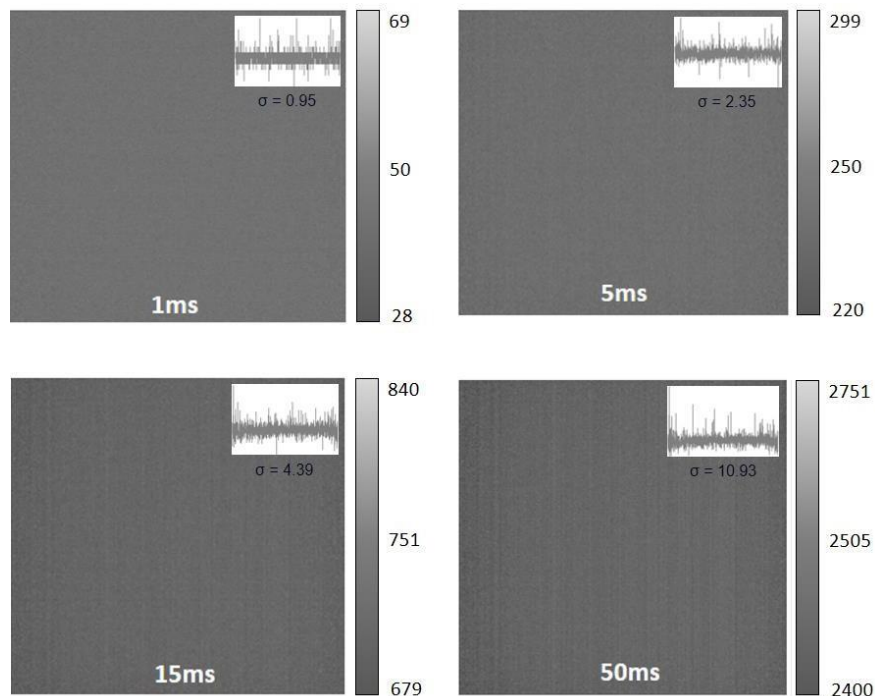


Figure III.19. Augmentation de la visibilité du FPN suite à l'augmentation du nombre d'images sommées. Les barres verticales représentent les valeurs de NdG. Les inserts correspondent à un profil de NdG le long de la dimension horizontale de l'image (ROI d'épaisseur 1 pixel). L'augmentation du temps d'exposition synthétique peut augmenter la variabilité inter-pixels.

3 VALIDATION *IN VITRO* DE L'APPROCHE MESI PAR EXPOSITION SYNTHÉTIQUE

Nous présenterons dans cette section la validation *in vitro* de l'approche par exposition synthétique. À cet effet, nous évaluerons le contraste speckle ainsi que les temps de décorrélation extraits de l'ajustement non-linéaire (Équation III.21) sur un modèle microfluidique représentatif de la physiologie murine cérébrale. Le but est de prouver que l'approche synthétique est capable de suivre les variations relatives du débit tout comme l'approche modulée traditionnellement employée en MESI.

3.1 SYSTÈME MICROFLUIDIQUE À DÉBIT ET PRESSIION CONTRÔLÉS

Un système microfluidique est utilisé pour générer des débits précis dans une plage de débits sanguins physiologiques à l'échelle de la microcirculation, compris entre 1 et 8 $\mu\text{l}/\text{min}$ ce qui

correspond à des vitesses entre 0.5 et 30 mm/s. Le système est muni d'un contrôleur de pression (MFCS, système Maesflo, Fluigent, Kremlin Bicêtre, France) et d'un moniteur de débit en ligne (modèles S et XS, Fluigent, Kremlin Bicêtre, France) pour un asservissement en boucle fermée du débit. Ceci permet un contrôle rapide, précis et sans à coup comme dans les pousse-seringues souvent utilisés. Une puce microfluidique composée de différents canaux de largeurs représentatives des diamètres des vaisseaux sanguins de la microcirculation, compris entre 40 et 500 μm a été utilisée (Figure III.20). Cette puce a été fabriquée par des techniques de photolithographie. À partir d'un moule « master » sur wafer de silicium, une puce en PDMS (Polydiméthylsiloxane) est fabriquée à l'aide d'un mélange de prépolymère PDMS et d'agent de durcissement dans un rapport de 10:1 (kit élastomère silicone Sylgard 184, Neyco, France). Une fois démoulé, les canaux de la puce microfluidique sont refermés par un couvercle en PDMS transparent d'environ 200 μm d'épaisseur sans aucun diffuseur statique, scellé sur la puce en PDMS après fonctionnalisation sous plasma O_2 . Une solution d'intralipide (I141, Sigma Aldrich) est utilisée comme fluide d'écoulement. La solution a été diluée à 2 % pour reproduire les propriétés optiques de diffusion du sang (Andre Roggan et al., 1999; A. Roggan et al., 1999; Michels et al., 2008).

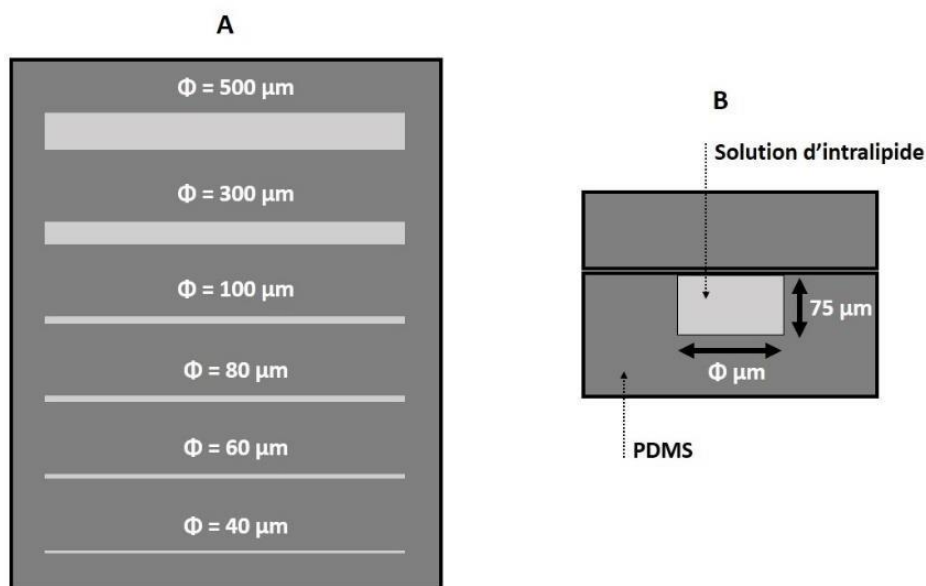


Figure III.20. Puce microfluidique. (A) Schéma représentatif de la puce microfluidique et des canaux de différents diamètres la constituant. (B) Représentatif de la dimension d'un canal de diamètre $\Phi \mu\text{m}$. Tous les canaux ont la même hauteur de 75 μm .

Les images de contraste speckle ont été acquises pour différents débits dans les canaux microfluidiques transparents ayant une section rectangulaire de $\Phi \mu\text{m}$ de largeur, 75 μm de hauteur et 1 cm de longueur. Dans ce qui suit, la contribution des bruits au contraste speckle est présentée pour un canal de 300 μm et un débit de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, pris comme exemple représentatif.

3.2 CARACTÉRISATION EXPÉRIMENTALE DES CONTRIBUTIONS DES BRUITS AU CONTRASTE SPECKLE DANS LES DEUX APPROCHES MESI

Comme détaillé à la section 2.4.3 de ce chapitre, la variance due aux différents bruits doit être évaluée et soustraite de la variance brute pour obtenir une estimation correcte du contraste speckle lié à la vitesse des globules rouges en mouvement. Les Figures III.21.A et III.21.B montrent l'évaluation des écarts-types de l'image brute σ_{raw} ainsi que ceux des bruits d'obscurité σ_{dark} , et de grenaille σ_{shot} en fonction du temps d'exposition T en exposition modulée et en exposition synthétique respectivement. En pratique, la mesure d'intérêt pour l'évaluation du débit sanguin en imagerie speckle est le contraste speckle local K . Les Figures III.21.C et III.21.D montrent l'évolution du contraste speckle brut K_{raw} ainsi que la contribution des contrastes des bruits d'obscurité (K_{dark}) et de grenaille (K_{shot}) pour les deux approches d'acquisition en fonction du temps d'exposition.

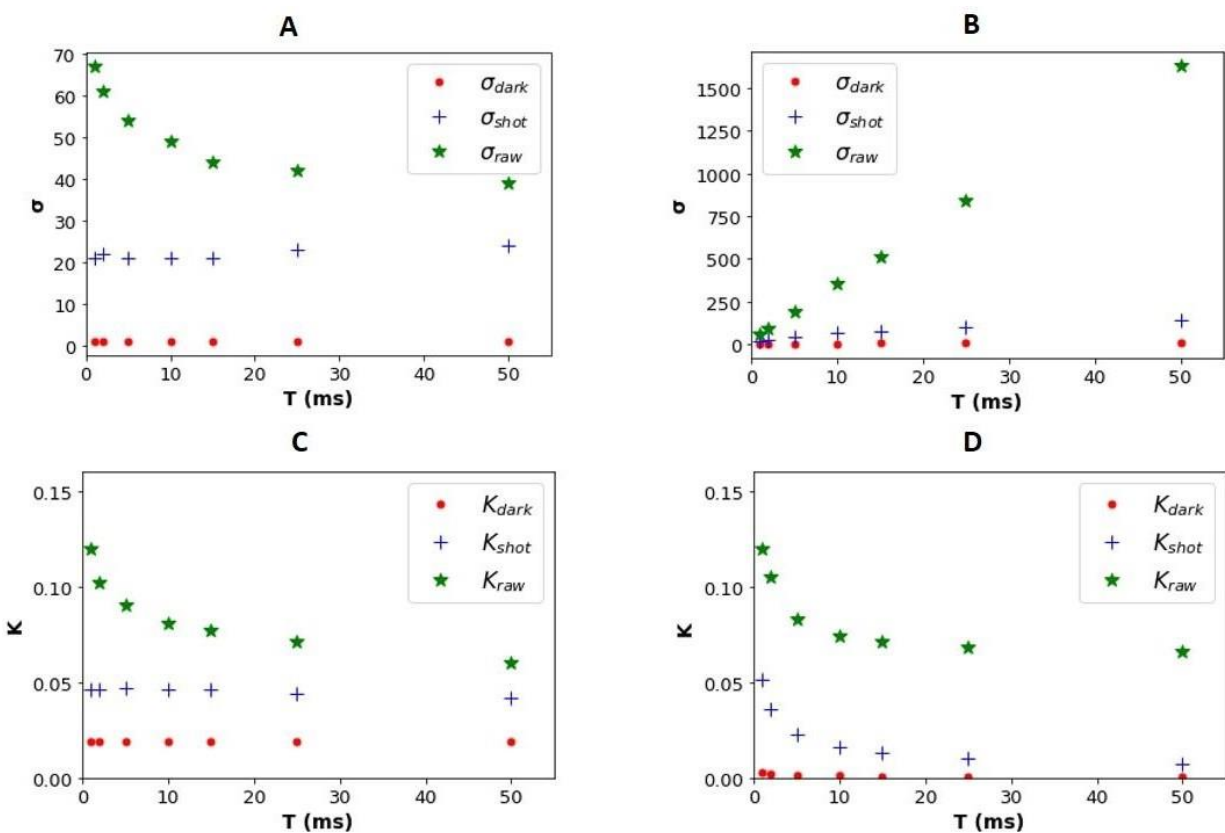


Figure III.21. Comparaison de la contribution des bruits en exposition modulée et en exposition synthétique pour un canal de $300 \mu\text{m}$ et un débit de $2 \mu\text{l}/\text{min}$. (A) Écarts-types de l'image brute et des bruits (d'obscurité, de lecture et de grenaille) dans le mode d'exposition modulée en fonction du temps d'exposition. (B) Identique à (A) pour l'approche d'exposition synthétique. (C) Contrastes bruts dus aux bruits d'obscurité et de lecture, et dû au bruit de grenaille pour l'approche d'exposition modulée. (D) Identique à (C) pour l'approche d'exposition synthétique.

BRUIT DE GRENAILLE

En MESI modulé (Figure III.21.A), l'écart-type du bruit de grenaille reste constant pour tous les temps d'exposition, puisque pour chaque condition, une seule image est acquise et la quantité de lumière détectée est maintenue constante pour tous les temps d'exposition (définis par la largeur de l'impulsion laser) en ajustant l'intensité du laser inversement à la durée des impulsions. En MESI synthétique (Figure III.21.B), la variance théorique liée au bruit de grenaille augmente linéairement avec le nombre d'images sommées (c'est-à-dire le « temps d'exposition synthétique ») et comme attendu, l'écart-type mesuré augmente comme la racine carrée du temps d'exposition. Le signal synthétique calculé résulte de la somme d'images obtenues en limite de saturation à 1 ms de temps d'exposition. Ceci donne aux images synthétiques une dynamique beaucoup plus élevée que celle permise par la profondeur limitée des puits associés aux pixels. En d'autres termes, si un pixel est déjà proche de la saturation d'intensité pour une image unique à un temps d'exposition de 1 ms, l'ajout de 10 images ne saturera pas l'image synthétique de 10 ms comme le ferait une exposition unique réelle de 10 ms. L'écart-type du bruit de grenaille augmente comme la racine carrée du nombre d'images, alors que le signal augmente linéairement avec le nombre d'images, ce qui entraîne une diminution théorique de la contribution relative de ce bruit au contraste de speckle en $\frac{1}{\sqrt{N} \cdot I_{\text{une image}}}$, où N est le nombre d'images additionnées et $I_{\text{une image}}$ est le niveau d'intensité d'une image en unités d'électrons (Figure III.22).

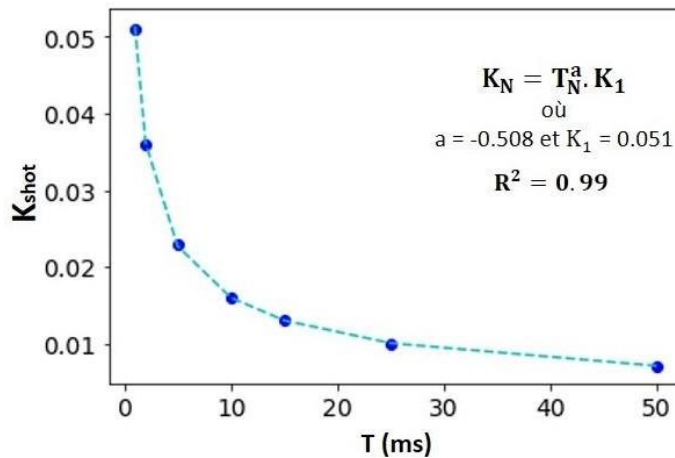


Figure III.22. Contraste dû au bruit de grenaille K_{shot} en fonction du temps d'exposition (ou du nombre d'images additionnées) en exposition synthétique.

BRUITS D'OBSCURITÉ ET DE LECTURE

En ce qui concerne les bruits d'obscurité et de lecture, en MESI modulé, une seule image est lue avec un temps d'exposition de la caméra identique ce qui conduit à des variances et écarts-types de lecture et d'obscurité constants quel que soit le temps d'exposition. Il est important de noter que cela n'est vérifié que si aucune variation de la lumière ambiante et de la température n'interviennent durant l'acquisition, ce qui est le cas dans nos conditions expérimentales. En MESI

synthétique, des images individuelles sont ajoutées pour créer des temps d'exposition longs, de sorte que la variance des bruits d'obscurité et de lecture devrait augmenter linéairement avec le temps d'exposition et l'écart-type devrait augmenter en fonction de la racine carrée du temps d'exposition. Pour le bruit de grenaille, cette hypothèse est respectée (Figure III.23.A) mais pour le bruit de l'obscurité, l'écart-type présente une dépendance à deux termes (somme de la racine carrée et d'un terme linéaire) avec le temps d'exposition (Figure III.23.B). Cette contribution linéaire inattendue est importante pour les temps d'exposition plus longs et est très probablement due à un bruit de type FPN. En effet bien que la caméra utilisée présente des DSNU et PRNU faibles et implémente une correction efficace de FPN, ce signal difficilement discernable sur une seule image, même à des temps d'exposition élevés, devient significatif après la sommation de plusieurs images (cf. Figure III.19).

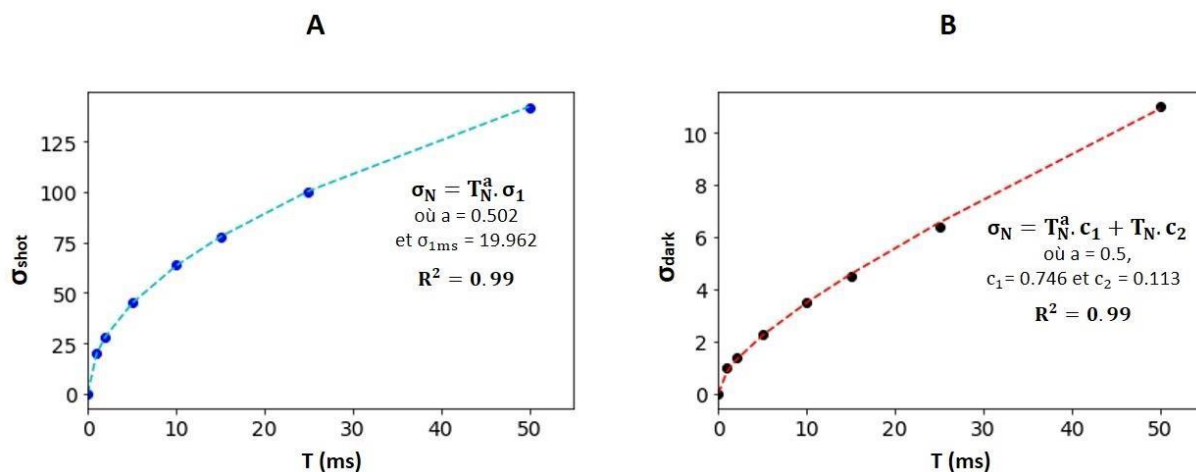


Figure III.23. Écart-types du bruit de grenaille (A) et du bruit d'obscurité (B) en fonction du temps d'exposition (ou du nombre d'images additionnées) en exposition synthétique.

3.3 CONTRIBUTION RELATIVE DU BRUIT DE GRENAILLE AU CONTRASTE SPECKLE EN MESI SYNTHÉTIQUE SELON LES CONDITIONS D'IMAGERIE

INFLUENCE DE L'INTENSITÉ DU SIGNAL SUR LA CONTRIBUTION DU BRUIT DE GRENAILLE

La contribution relative du bruit de grenaille au contraste speckle brut dépend de l'intensité du signal détecté et constitue la contribution principale au bruit pour une large gamme d'intensités détectées. En exposition synthétique, la contribution du bruit de grenaille est déterminée par le niveau du signal détecté au temps d'exposition le plus faible et par le nombre d'images additionnées pour calculer les images de contraste speckle pour chaque temps d'exposition. Dans la section précédente nous nous sommes placés expérimentalement dans le cas idéal où la dynamique du capteur est utilisée au maximum. Ceci est facilement réalisable pour les études sur modèles animaux avec des diodes laser de puissance de l'ordre de quelques centaines de mW. Cependant, c'est une condition plus difficile à atteindre pour des applications cliniques. En effet,

celles-ci exigent l'illumination d'un large champ et donc la répartition de la puissance du laser sur une surface de plusieurs dizaines de cm^2 contre quelques mm^2 en imagerie préclinique. Par ailleurs, les contraintes de sécurité en milieu clinique peuvent également limiter la puissance des diodes laser utilisées. Dans ce contexte, nous avons évalué (Figure III.24) l'influence de la correction des bruits pour différents niveaux d'illumination de l'échantillon, allant de l'utilisation optimale de la gamme dynamique de la caméra (quasi-saturation des puits) à un niveau de signal sous-optimal (moins de la moitié de la profondeur des puits est utilisée). Pour une utilisation maximale de la dynamique de la caméra, la contribution relative du bruit de grenaille est modeste, même pour le temps d'exposition le plus court (Figure III.24.A, illumination à 223 mW/cm^2 , $T = 1 \text{ ms}$). Lorsque le niveau du signal n'est pas optimal, la contribution relative du bruit de grenaille est nettement plus élevée (Figure III.24.A, illumination à 20 mW/cm^2 , $T = 1 \text{ ms}$). La Figure III.24.B montre qu'en régime d'illumination sous-optimal la contribution relative du bruit de grenaille au contraste speckle augmente avec les temps d'exposition courts nécessaires pour détecter la variation du contraste due à un débit rapide. Ainsi, la Figure III.24.C montre que la contribution relative du bruit de grenaille au contraste speckle atteint 15 % lorsque l'acquisition est faite sous un faible éclairage (20 mW/cm^2) et pour un T court. Au contraire, cette contribution est limitée à moins de 2 % pour tous les temps d'exposition lorsqu'une illumination optimale (223 mW/cm^2) est utilisée.

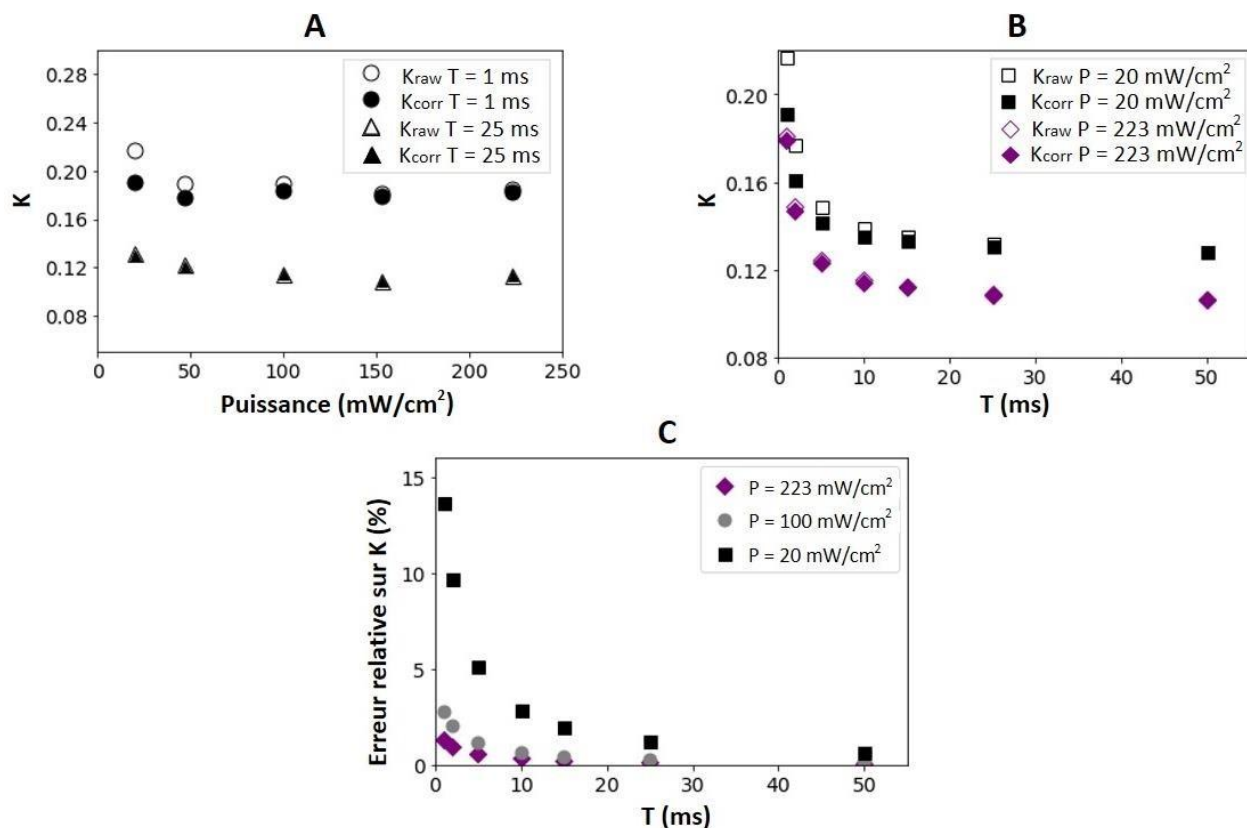


Figure III.24. Effet du niveau d'illumination et du temps d'exposition sur la contribution relative du bruit de grenaille au contraste speckle en exposition synthétique. (A) Effet de l'intensité lumineuse détectée; les cercles vides (K_{raw}) et les cercles pleins (K_{corr}) correspondent à un temps d'exposition de 1 ms; les triangles (K_{raw} et K_{corr}) correspondent à un temps d'exposition de 25 ms. (B) Effet du temps d'exposition T (ms) sur la contribution relative du bruit de grenaille au contraste speckle pour deux niveaux d'illumination (20 mW/cm^2 et 223 mW/cm^2). (C) Effet du temps d'exposition T (ms) sur la contribution relative du bruit de grenaille au contraste speckle pour trois niveaux d'illumination (20 mW/cm^2 , 100 mW/cm^2 et 223 mW/cm^2).

vides (K_{raw}) et les triangles pleins (K_{corr}) correspondent à un temps d'exposition de 25 ms. (B) Effet du temps d'exposition; les carrés noirs vides (K_{raw}) et les carrés noirs pleins (K_{corr}) correspondent à une illumination de 20 mW/cm²; les losanges violets vides (K_{raw}) et les losanges violets pleins (K_{corr}) correspondent à une illumination de 223 mW/cm². (C) Erreur relative due à K_{shot} en fonction du temps d'exposition pour différents niveaux d'illumination; les carrés, les cercles et les losanges correspondent respectivement à des illuminations de 20, 100 et 223 mW/cm². L'erreur sur K est calculée selon l'équation $|\frac{K_{raw}-K_{corr}}{K_{corr}}| \times 100$.

INFLUENCE DU DÉBIT ETUDIÉ SUR LA CONTRIBUTION RELATIVE DU BRUIT DE GRENAILLE

La contribution absolue du bruit de grenaille au contraste speckle est indépendante du débit imagé. Cependant, sa contribution relative dépend de la valeur du contraste speckle effectivement lié au débit. En effet, en imagerie speckle dynamique, les débits élevés entraînent un contraste plus faible, tandis que les débits faibles entraînent des valeurs de contraste plus élevées. En conséquence, la Figure III.25 montre que pour toute la gamme de temps d'exposition considérée, la contribution relative du bruit est beaucoup plus élevée pour un débit de 8 µl/min que pour un débit de 2 µl/min. Par ailleurs, la contribution relative du bruit de grenaille en exposition synthétique diminue avec l'augmentation de T quel que soit le débit. Si l'éclairage optimal permet l'utilisation de toute la dynamique de la caméra, alors l'erreur observée sur l'estimation du contraste reste inférieure à 2 % sur toute la gamme des débits représentatifs de la microcirculation.

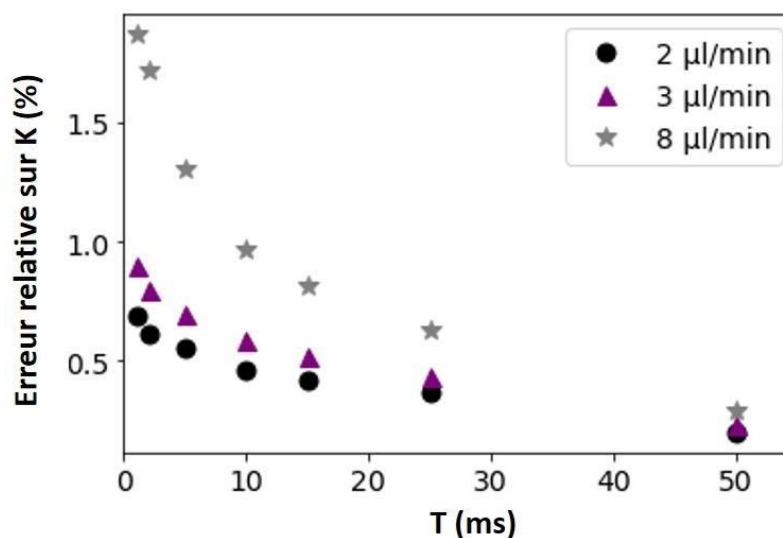


Figure III.25. Erreur relative sur le calcul du contraste speckle due à la contribution des bruits en fonction du temps d'exposition pour différents débits d'intralipide-2% dans un canal de 300 µm de diamètre. Les données ont été acquises en exposition synthétique, avec des images de 1 ms de temps d'exposition, et sous un éclairage optimal utilisant toute la dynamique du capteur de la caméra.

3.4 EFFET DE LA DURÉE INTER-IMAGES SUR L'ÉVALUATION DU CONTRASTE SPECKLE EN EXPOSITION SYNTHÉTIQUE

Lorsque la caméra est utilisée en plein champ (1920 x 1440 pixels), la durée inter-images minimale (Δi) entre le début de deux expositions successives est fixée à 21.2 ms par l'électronique de vitesse de lecture (soit 46 images/s environ). En exposition synthétique, les images d'exposition courte (acquises à 1 ms de temps d'exposition) sont additionnées pour créer des temps d'exposition plus longs. La fréquence d'images peut être augmentée jusqu'à 714 Hz si la lecture des pixels est limitée à une région d'intérêt de 50 x 50 pixels ($\Delta i = 0.4$ ms). En effet, plus Δi est court, plus l'échantillonnage temporel de la décorrélation de la figure de speckle est précis. Des données pour différents Δi ont été obtenues (Figure III.26) sur le canal de 300 μm pour des débits entre 1 et 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Nous observons peu de différences sur les contrastes mesurés, mais néanmoins une légère diminution pour les Δi les plus faibles en particulier pour les temps d'exposition les plus longs et ce d'autant plus que le débit est élevé. Pour les différentes acquisitions, les temps de décorrélation ont été estimés par ajustement non-linéaire du modèle MESI (Équation III.21) sur les variations de contraste en fonction du temps d'exposition obtenues. Les valeurs de τ_c pour un même débit restent comparables quelques soit la durée inter-image. En conclusion, bien que l'acquisition MESI synthétique avec notre caméra implique un sous-échantillonnage temporel au regard des temps de décorrélation attendus, nous observons pour la solution d'intralipide-2% des valeurs de τ_c cohérentes entre elles quelques soient les durées inter-images et les débits considérés.

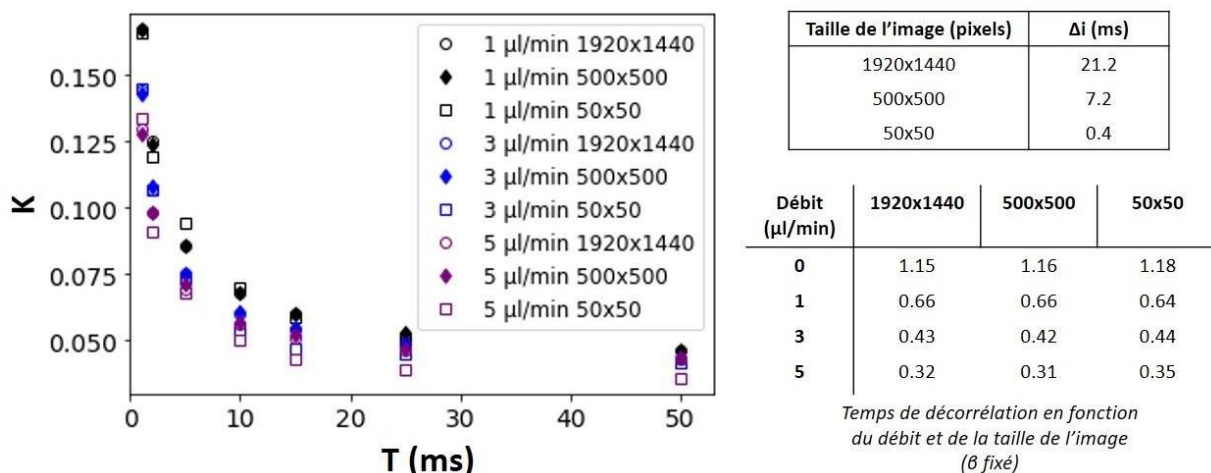


Figure III.26. Effet de la fréquence d'images et de la durée inter-images sur l'évaluation du contraste speckle K_{corr} en exposition synthétique. L'acquisition en plein champ (1920 x 1440 pixels) correspond à une fréquence d'acquisition de 46 images/s et une durée Δi de 21.2 ms. La région d'intérêt de 500 x 500 pixels correspond à une acquisition à 122 images/s et une Δi de 7.2 ms. Une région d'intérêt de 50 x 50 pixels augmente la fréquence d'acquisition à 714 images/s et réduit Δi à 0.4 ms. Les symboles noirs correspondent au débit de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, les symboles bleus correspondent à un débit de 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ et les symboles violets à un débit de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ces données ont été obtenues pour le canal de 300 μm de diamètre.

3.5 COMPARAISON DIRECTE DE LA QUANTIFICATION RELATIVE DU DÉBIT PAR EXPOSITIONS MODULÉE ET SYNTHÉTIQUE

Nous avons acquis des images de speckle séquentiellement avec les deux approches MESI pour des débits allant de 1 à 8 $\mu\text{l}/\text{min}$ de la solution d'intralipide-2% dans différents canaux microfluidiques. Des images représentatives du contraste speckle corrigé des bruits pour trois temps d'exposition différents (1, 5 et 20 ms) sont montrées pour les deux approches MESI dans le canal de 300 μm de diamètre (Figure III.27). Les valeurs de contraste speckle diminuent avec l'augmentation du débit et du temps d'exposition et ceci pour les deux méthodes d'acquisition.

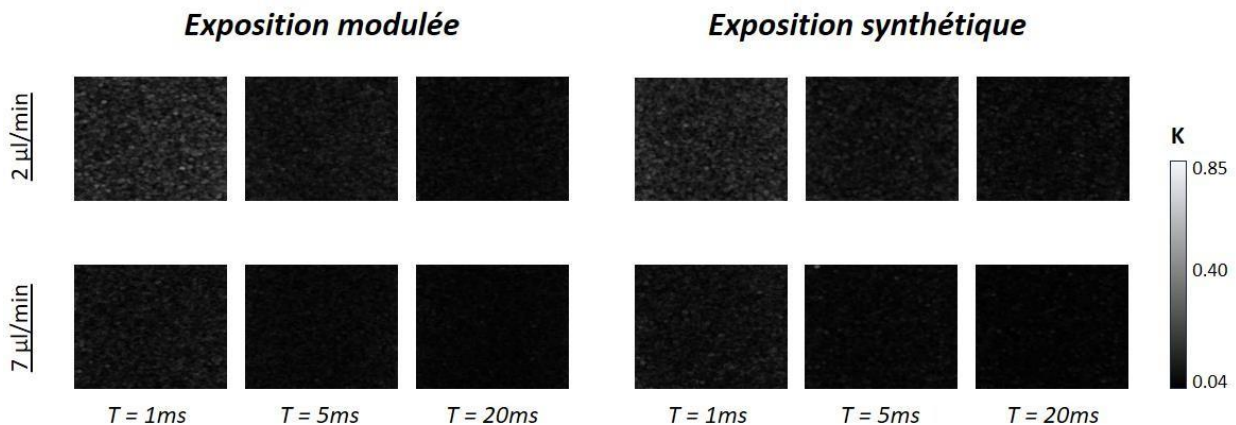


Figure III.27. Images du contraste speckle d'une solution d'intralipide-2% pour différents débits (2 et 7 $\mu\text{l}/\text{min}$) et différents temps d'exposition ($T = 1, 5$ et 20 ms) dans un canal de 300 μm pour les deux approches d'acquisition.

La Figure III.28.A montre les valeurs de contraste speckle correspondantes pour les deux modes d'acquisition. Nous voyons que, pour les temps d'exposition courts, les contrastes sont plus élevés en synthétique qu'en MESI modulé et inversement pour les temps longs. La Figure III.28.B montre les temps de décorrélation obtenus à partir de l'exposition synthétique en fonction de ceux obtenus à partir de l'acquisition en exposition modulée. Pour le fantôme utilisé, les temps de décorrélation mesurés en exposition modulée sont compris entre 0 et 1.2 ms, ce qui est représentatif de ce qui a été observé *in vivo* chez la souris en utilisant une mesure directe de la fonction d'autocorrélation de l'intensité $g_2(\tau)$ (Postnov et al., 2020). Les données expérimentales montrent une bonne linéarité entre les temps de décorrélation obtenus à partir des deux modes d'acquisition, mais la pente n'est pas unitaire. Les temps de décorrélation obtenus à partir de l'exposition synthétique sont significativement plus élevés que ceux obtenus à partir de l'exposition modulée, ceci pour toutes les conditions de débit. En l'état, les raisons de ces différences ne sont pas claires. Plusieurs hypothèses sont possibles: un biais dans la correction des bruits, l'effet de l'échantillonnage temporel différent entre MESI modulée et MESI synthétique, une influence plus grande pour le MESI synthétique des bruits non pris en compte comme l'instabilité potentielle de l'intensité de la source laser. Une manière élégante d'étudier ce problème consisterait à utiliser une caméra

ultrarapide pour réaliser une mesure directe de la fonction d'autocorrélation $g_2(\tau)$ pour obtenir une valeur absolue des temps de décorrélation. Néanmoins, bien que la quantification absolue des temps de décorrélation ne soit pas obtenue, la linéarité de la relation entre les temps d'exposition déterminés par les deux méthodes indique que la mesure des variations relatives du débit dans la gamme considérée est possible en MESI synthétique. L'absence de quantification absolue ne constitue pas un réel obstacle puisque la technique LSCI est par essence une méthode relative. L'absence de relation exacte établie entre le temps de décorrélation et le débit ne permet de toute façon pas une quantification absolue du débit en imagerie speckle. Malgré cela, l'imagerie speckle est largement utilisée en préclinique et clinique pour déterminer des variations relatives du débit sanguin.

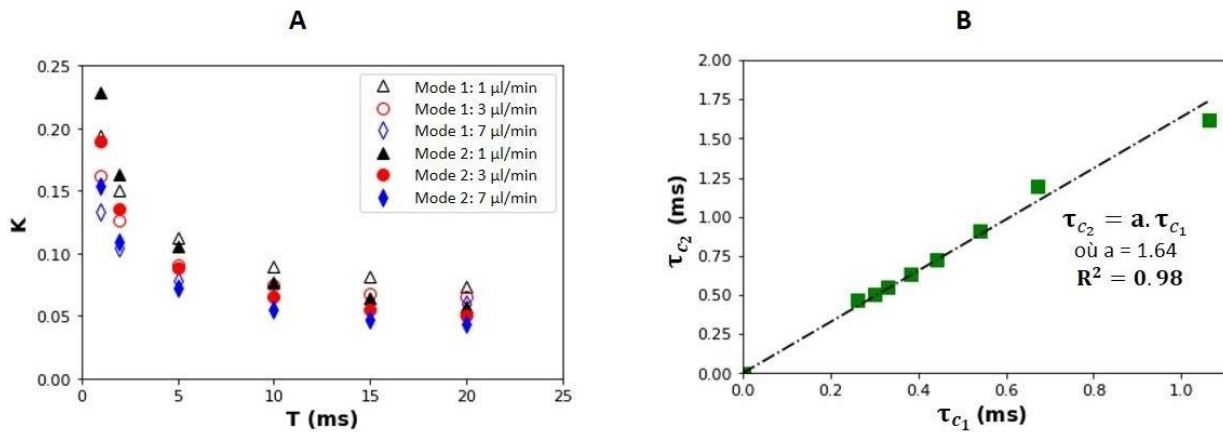


Figure III.28. Comparaison entre le mode 1 (exposition modulée) et le mode 2 (exposition synthétique). (A) Contraste speckle corrigé des bruits dans les deux modes pour des débits de 1, 3 et 7 $\mu\text{l}/\text{min}$ dans un canal de 300 μm de diamètre en fonction du temps d'exposition. Les symboles vides correspondent au mode 1; les symboles pleins correspondent au mode 2. Les débits sont représentés par des couleurs différentes. (D) Temps de décorrélation mesuré par MESI synthétique (τ_{c_2}) en fonction de ceux mesurés par MESI modulé (τ_{c_1}) pour tous les débits allant de 1 à 8 $\mu\text{l}/\text{min}$.

4 EFFET DU MOUVEMENT SUR L'ÉVALUATION DU CONTRASTE SPECKLE EN EXPOSITION SYNTHÉTIQUE

Un biais supplémentaire, rarement pris en compte pour la mesure du contraste speckle, est lié aux mouvements globaux des tissus provenant du déplacement du sujet et en particulier, concernant l'imagerie cérébrale chez le rongeur, des mouvements du cerveau liés à la respiration pendant l'acquisition. En S-LSCI clinique, il a été montré que ces mouvements peuvent entraîner des diagnostics erronés (Zötterman et al., 2017). Dans cette section, nous étudions le biais éventuel dans le calcul du contraste speckle pour une gamme représentative de vitesses de mouvement dans le cadre de l'imagerie cérébrale chez le rongeur. D'autres ont évalué l'artefact du mouvement en imagerie speckle (Omarjee et al., 2015; Lertsakdadet et al., 2019; Chizari et al., 2021; X. Liu et al., 2021). Cependant, cela a été fait en S-LSCI principalement. Dans notre cas, le système d'imagerie est fixe, mais des mouvements non pertinents peuvent être rencontrés dans la scène observée. Les effets de la vitesse et de la direction du mouvement non désiré ont été évalués pour

les mouvements latéraux (x-y) et axiaux (z) en MESI synthétique. Différentes combinaisons de vitesse de mouvement, de directions (latérale/axiale) et de paramètres instrumentaux (fréquence d'images, durée inter-images, ouverture numérique et niveau de grandissement, profondeur de champ) ont été testées pour déterminer leur impact sur la mesure du contraste speckle.

4.1 PRÉSENTATION DU MONTAGE POUR L'ÉVALUATION DE L'EFFET DES MOUVEMENTS

Le dispositif d'imagerie utilisé est celui de l'imagerie MESI en exposition synthétique (Figure III.14). Pour générer des mouvements globaux contrôlés de l'ensemble de la solution contenant les diffuseurs en mouvement brownien, nous avons utilisé une platine motorisée (MTS50C-Z8, Thorlabs) pour générer des déplacements latéraux ou axiaux par rapport au plan focal du système (Figure III.29). Ce montage et cette étude ont été réalisées dans le cadre du stage de Flora Silberzian (1^{ère} année Ingénieur SupOptique). Des solutions en mouvement brownien composées d'un mélange de la solution d'intralipide-2% et de glycérine ont été caractérisées pour fournir des échantillons calibrés en termes de temps de décorrélation des diffuseurs. Une concentration de glycérine élevée correspond à un τ_c de plusieurs millisecondes, valeur proche de ce qui est observé dans les petits capillaires, tandis qu'une faible concentration de glycérine correspond à un τ_c de moins d'une milliseconde, comme dans les grandes artérioles. Des solutions de 0, 15, 25, 50 et 58 % en volume massique en glycérine ont été préparées pour ajuster les temps de décorrélation dans une gamme correspondant à l'imagerie *in vivo* de la circulation sanguine. Un tube de 0.86 mm de diamètre interne a été rempli avec ces solutions de différentes viscosités. Les expériences sont faites dans un environnement climatisé à température constante. Les données de speckle à expositions multiples ont été obtenues pour les temps d'exposition de 1, 2, 5, 10, 15, 25 et 50 ms.

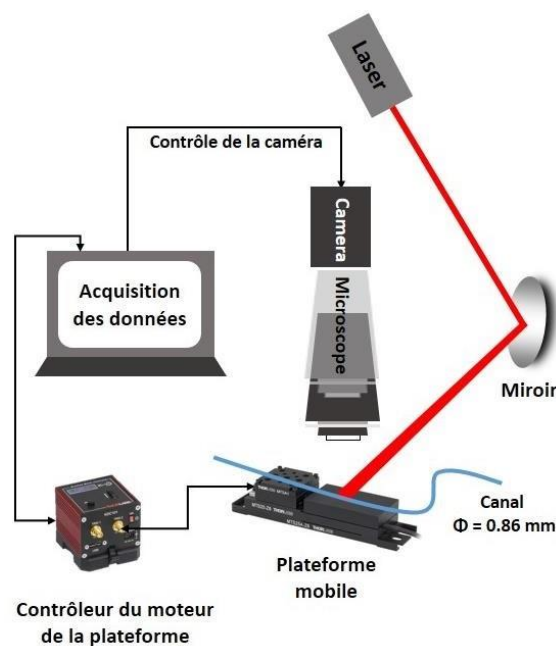


Figure III.29. Dispositif d'évaluation des artefacts de mouvement en MESI synthétique.

La Figure III.30 montre la caractérisation des solutions. Le temps de décorrélation déterminé expérimentalement pour les différentes solutions « intralipide-glycérine » varie linéairement avec la viscosité théorique des solutions (Duclaux, 1940; Segur et al., 1951) (Figure III.30.B) ce qui est en accord avec la loi de Stokes-Einstein qui prévoit la linéarité entre ces deux paramètres pour le mouvement brownien.

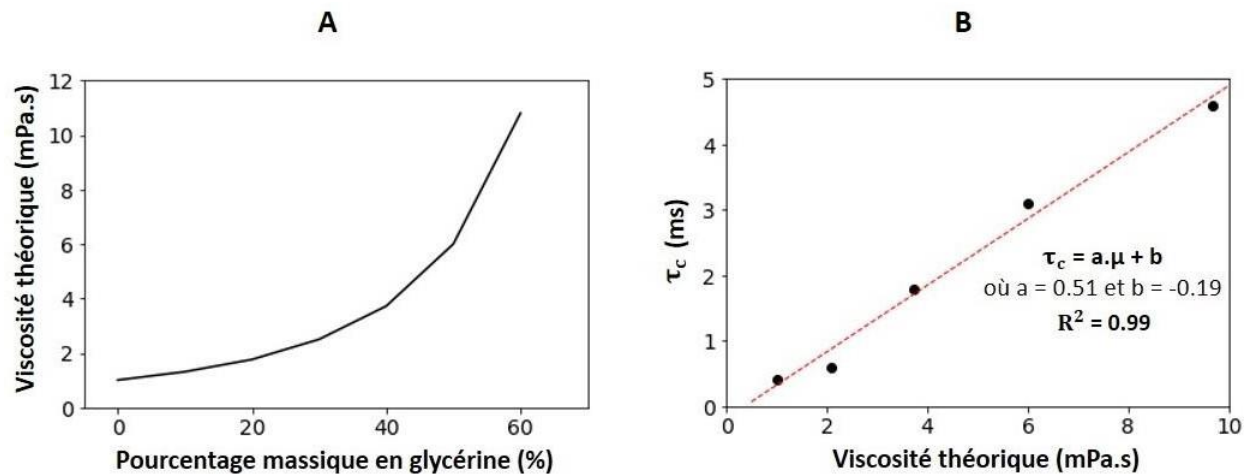


Figure III.30. Caractérisation des solutions « intralipide-glycérine ». (A) Courbe théorique de la viscosité en fonction du pourcentage massique de la solution en glycérine (Segur et al., 1951). (B) Variation du τ_c des différentes solutions (en mouvement brownien) en fonction de la viscosité théorique.

4.2 APPROCHE D'ÉVALUATION DU BIAIS LIÉ AUX MOUVEMENTS LATÉRAUX

Le canal de diamètre 0.86 mm, fixé sur la platine motorisée a été d'abord rempli d'une solution d'intralipide-2% pure. La solution injectée a été laissée au repos pendant plusieurs minutes pour assurer sa stabilisation mécanique et thermique (régime brownien stationnaire). La platine a été calibrée et réglée pour se déplacer horizontalement dans le plan x-y à différentes vitesses constantes afin d'évaluer l'impact de la vitesse du mouvement sur le contraste speckle. L'acquisition des images est déclenchée par le trigger externe de la platine lorsque la vitesse atteint sa valeur consigne constante. Les images ont été recalées spatialement à l'aide du plugin FIJI StackReg avant le calcul du contraste. Ces mesures ont été effectuées pour différentes durées inter-images contrôlées en réduisant la taille des images acquises. Dans un premier temps, la platine se déplace horizontalement dans le plan x-y le long de l'axe du canal. La Figure III.31.A montre l'évolution du contraste speckle en fonction de la vitesse de la plateforme pour deux temps d'exposition différents et une ROI de 50 x 50 pixels ($\Delta t = 0.4$ ms). Après recalage des images, le contraste speckle est indépendant de la vitesse de la plateforme pour ces deux temps d'exposition. La Figure III.31.B montre le contraste speckle en fonction du temps d'exposition pour trois vitesses de la plateforme, 0.1, 0.5 et 2 mm/s.

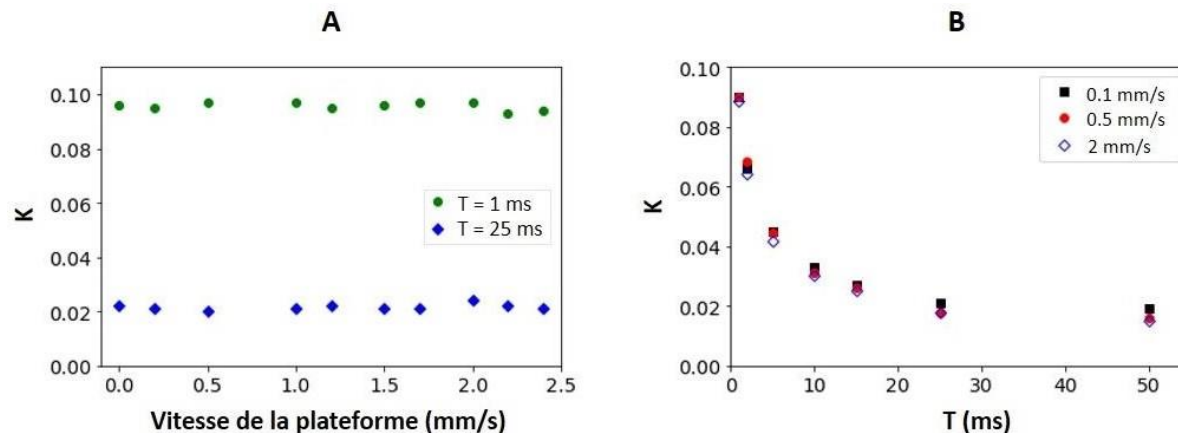


Figure III.31. Évaluation de l'effet du mouvement latéral sur le contraste speckle pour la solution d'intralipide-2% en mouvement brownien. (A) Contraste speckle en fonction de la vitesse de déplacement de la plateforme pour deux temps d'exposition. (B) Contraste speckle en fonction du temps d'exposition pour des vitesses de déplacement de la platine de 0.1, 0.5 et 2 mm/s.

Dans un second temps, les solutions d'intralipide-2%, toujours en mouvement brownien mais avec une viscosité ajustée par ajout glycérine, ont été utilisées pour remplir le tube. La Figure III.32 montre le biais introduit dans l'évaluation du contraste speckle en fonction du temps d'exposition, de la vitesse de la plateforme et de la concentration de la solution en glycérine. La Figure III.32.A présente l'évolution de K en fonction de T pour la solution la plus concentrée en glycérine. Le biais dû au mouvement augmente avec la vitesse de déplacement. La Figure III.32.B montre les temps de décorrélation obtenus en fonction de la vitesse de la platine pour deux solutions de concentration en glycérine différentes. Le biais dans le cas de la solution à 25 % de glycérine est faible. Les valeurs de τ_c restent proches de celle obtenues pour une vitesse nulle sauf pour les vitesses les plus élevées du mouvement global, où une sous-estimation de τ_c est observée. Au contraire, pour la solution à 58 % de glycérine, l'effet du mouvement sur l'estimation de τ_c est bien visible même pour des déplacements globaux à faible vitesse. Sachant que le temps inter-images dans cette configuration d'imagerie (50 x 50 pixels) est de 0.4 ms, ces observations soulignent l'idée que plus τ_c est petit relativement à Δt , plus l'évaluation du contraste speckle est biaisé par le mouvement global. Ainsi, pour pouvoir mesurer le temps de décorrélation exact, l'échantillonnage temporel (autrement dit, Δt) doit respecter le théorème de Shannon-Nyquist ($\Delta t \leq \frac{\tau_c}{2}$).

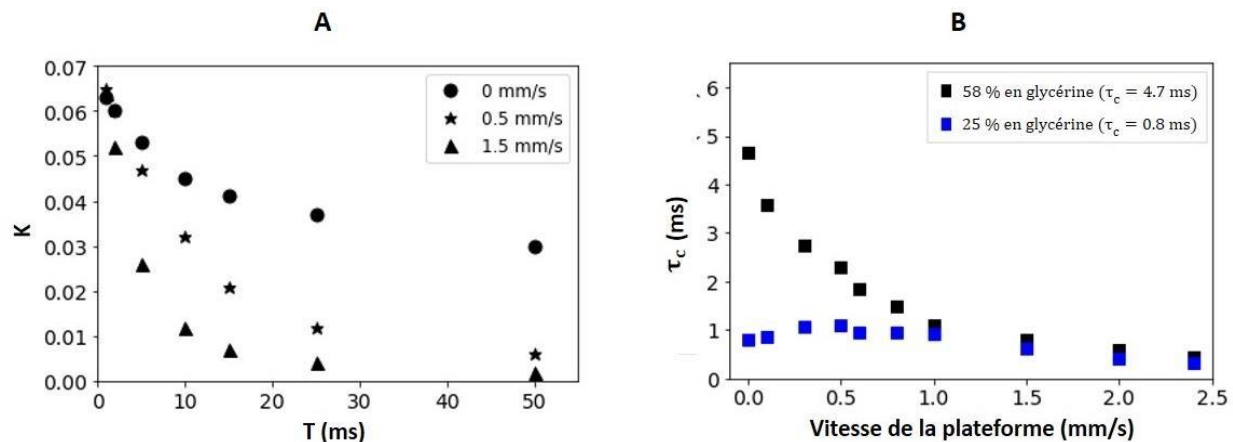


Figure III.32. Effet du mouvement latéral en fonction de la vitesse de déplacement, du temps d'exposition T , du temps de décorrélation τ_c et de la durée inter-images Δi . (A) Contraste speckle en fonction du temps d'exposition pour une solution d'intralipide-2% avec une concentration de 50 % en glycérine. (B) Variation de τ_c en fonction de la vitesse de la platine pour deux solutions d'intralipide-2% de concentrations différentes en glycérine.

4.3 ETUDE DU BIAIS LIÉ AUX MOUVEMENTS EN Z

Pendant l'acquisition, des mouvements le long de l'axe z (perpendiculaire au plan d'imagerie) sont possibles, notamment en raison des effets de pulsativité et surtout de la respiration. Le tissu imagé se déplace alors par rapport au plan focal du système d'imagerie. L'effet de ces déplacements sur les valeurs du contraste speckle est fonction de la profondeur de champ (d_{champ}) qui dépend elle-même du grandissement et de l'ouverture numérique utilisés. Nous avons étudié indépendamment l'impact de ces paramètres en déplaçant la platine le long de l'axe z de part et d'autre du plan focal à différentes vitesses et pour une amplitude maximale de ± 0.5 mm. La Figure III.33.A montre, pour deux valeurs de G , la variation du contraste normalisé par rapport à sa valeur maximale, en fonction de la position relative par rapport au plan focal. Nous observons que plus G est élevé, plus l'erreur relative sur K augmente en s'éloignant du plan de mise au point. Par ailleurs, plus l'ON est élevée, plus le contraste s'éloigne rapidement de sa valeur maximale en s'éloignant du plan de mise au point (Figure III.33.B). Typiquement, chez le petit animal anesthésié, l'amplitude maximale du mouvement respiratoire cérébral est aux alentours de $30 \mu\text{m}$, pour une configuration typique de craniotomie sans dure-mère (Gilletti et al., 2006). Dans ce cas le biais dus aux mouvements axiaux sur le calcul de K est inférieur à 5 %, valeur estimée pour le cas le plus défavorable (G et ON les plus grands). Dans un cadre clinique plus général, quand les mesures sont faites en présence d'un mouvement vertical qui peut être important, par exemple en imagerie peropératoire, la profondeur de champ devrait être judicieusement définie en ajustant des paramètres tels que l'ON et le G , avec les contraintes indiquées précédemment pour l'échantillonnage spatial correct des grains de speckle. Si des mouvements de l'ordre de quelques centaines de micromètres ou millimètres sont attendus, il paraît indispensable de les corriger. Pour les mouvements périodiques lents, une approche mise en œuvre très récemment consisterait à réaliser une acquisition synchronisée (« gated-acquisition ») des images de speckle et des images cardiaques. L'approche consiste à recalibrer les images de speckle en s'appuyant sur le mouvement

périodique global du cœur (Plyer et al., 2023). Pour des mouvements non périodiques, une seconde approche serait une calibration expérimentale des biais attendus sur fantôme *in vitro* puis une correction des signaux *in vivo* via la mesure en ligne des déplacements, par exemple en utilisant les variations du contraste mesuré sur une zone fixe, physiologique ou non, proche de la zone d'intérêt (Bahadori et al., 2017).

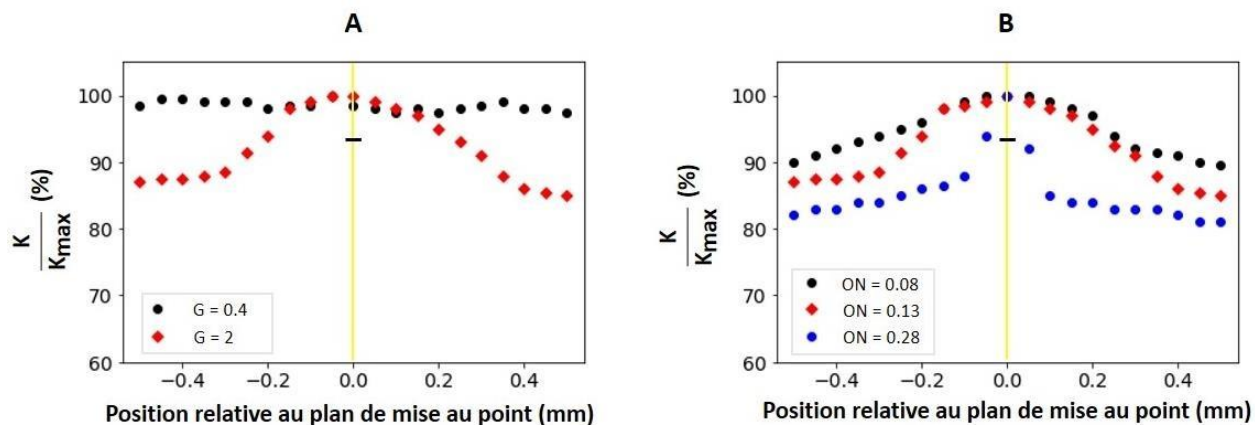


Figure III.33. Effet de l'ouverture numérique et du grandissement et de l'ouverture numérique sur la mesure du contraste speckle. (A) Variation du contraste normalisé en fonction de la position relative au plan de mise au point pour différents grandissements de l'optique (ON = 0.13). (B) Variation du contraste normalisé en fonction de la position relative au plan de mise au point pour différentes ouvertures numériques (G = 2). Les lignes jaunes indiquent la position du plan de mise au point (position de référence). Les mesures sont faites avec la solution d'intralipide-2% seule. Le trait noir horizontal correspond à un déplacement de 30 μm .

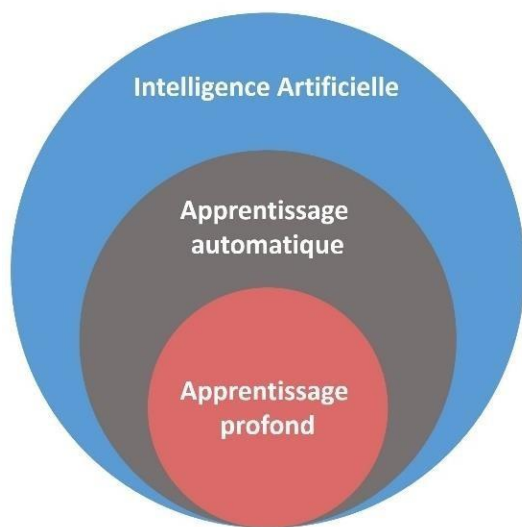
CONCLUSION

L'imagerie S-LSCI bénéficie d'une approche instrumentalement simple qui permet par une opération algébrique de déterminer un indice du débit sanguin à partir du calcul du contraste à un seul temps d'exposition. Néanmoins, il a été démontré que cette approche est biaisée en présence de diffuseurs fixes, et l'imagerie multi-exposition MESI a été proposée comme alternative. Bien que celle-ci soit supérieure à la S-LSCI en termes d'estimation des variations relatives du débit, elle n'a été adoptée que dans peu de dispositifs d'imagerie précliniques et dans aucun dispositif médical clinique du fait de sa double complexité instrumentale et méthodologique. Nous avons proposé une simplification de l'approche instrumentale de l'imagerie MESI par l'utilisation de l'acquisition en exposition synthétique de données de contraste speckle aux différents temps d'exposition. Dans cette approche, il est essentiel d'estimer et de corriger les bruits qui ne sont plus constants avec le temps d'exposition comme c'est le cas en imagerie MESI modulée. L'approche synthétique a été validée *in vitro* sur des canaux microfluidiques en comparaison avec l'approche d'exposition modulée qui est le « gold standard » utilisé en MESI. Si la quantification absolue des temps de décorrélation n'a pas été obtenue, leur estimation relative montre une très bonne linéarité avec celle obtenue en MESI modulé. Nous avons également étudié l'effet des mouvements indésirables, lors des acquisitions en imagerie speckle, et nous avons évalué leur contribution potentielle sur le contraste speckle dans les conditions d'imagerie *in vivo* sur souris anesthésiée telle qu'elle a été mise en œuvre dans le Chapitre VI. En conclusion, ces développements valident l'approche d'imagerie MESI synthétique avec une instrumentation basée sur une simple caméra sCMOS. Cette simplification instrumentale importante permet de lever une des contraintes fortes qui ont limité jusqu'à présent l'adoption de l'imagerie MESI dans les dispositifs médicaux. Le second frein majeur à l'application clinique est le temps d'analyse requis par l'ajustement pour chaque pixel du champ de vue d'un modèle non-linéaire multiparamétrique sur des données expérimentales. Dans le chapitre suivant, nous avons développé et évalué la mise en place des réseaux de neurones comme alternative « temps-réel » à l'ajustement non-linéaire pour l'analyse des données MESI.

CHAPITRE IV. IMPLÉMENTATION DE RÉSEAUX DE NEURONES POUR L'ANALYSE DES DONNÉES MESI

1	Les réseaux de neurones: une approche ancienne en pleine expansion	91
1.1	Du cerveau humain aux réseaux de neurones modèles	91
1.2	Architectures des réseaux de neurones pour l'apprentissage profond	93
1.3	Différentes approches d'apprentissage des réseaux de neurones	95
1.4	Apprentissage supervisé par rétropropagation des erreurs: principes d'implémentation	96
1.5	Les réseaux de neurones en imagerie biomédicale en 2023	98
1.6	État de l'art de l'application des réseaux de neurones en imagerie du contraste speckle dynamique	100
2	Architecture des réseaux convolutifs développés pendant la thèse	104
2.1	Réseau résiduel multicanaux: MSR-Net	107
2.2	Réseau résiduel tridimensionnel: Res3D-Net	107
2.3	Comment les architectures choisies permettent de gérer le problème de disparition du gradient ?	108
2.4	Choix de la fonction d'activation	108
3	Implémentation et entraînement supervisé des réseaux de neurones développés au cours de la thèse	109
3.1	Paramètres importants pour l'entraînement	109
3.2	La base de données d'entraînement	111
3.3	Génération des cartes cibles de débit	114
3.4	Génération des patches pour l'apprentissage et la validation	116
3.5	Implémentation et validation croisée des réseaux de neurones MSR-Net et Res3D-Net	117
3.6	Prédiction des cartes de débit à partir des réseaux entraînés	120
4	Performances des réseaux de neurones développés	121
4.1	Comparaison des performances des réseaux de neurones: MSR-Net <i>versus</i> Res3D-Net	121
4.2	Comparaison de l'approche par réseau de neurones à la méthode d'ajustement non-linéaire	123
	Conclusion	127

L'intelligence artificielle (IA) fait référence à la capacité d'un système informatique à imiter certaines fonctions cognitives humaines, telles que l'apprentissage et la prise de décision. L'apprentissage automatique (ou « machine learning ») est une sous-discipline de l'IA qui se concentre sur le développement d'algorithmes et de modèles statistiques permettant aux machines d'apprendre à partir de données et de prendre des décisions ou de prédire des résultats sans être explicitement programmées pour chaque situation. On distingue plusieurs types de tâches réalisables par apprentissage automatique: la classification consiste à prédire une catégorie ou une classe discrète des données (i.e. cellules cancéreuses *versus* saines), tandis que la régression est employée pour prédire une valeur continue ou numérique d'une variable (i.e. le débit sanguin). À son tour, l'apprentissage automatique englobe l'apprentissage profond (ou « deep learning ») (Figure IV.1), une technique spécifique utilisée pour entraîner des réseaux de neurones à « apprendre » des représentations complexes des données. Les réseaux de neurones sont utilisés dans de nombreux domaines, notamment le traitement d'images (Ongsulee, 2017). Dans ce chapitre, et après l'introduction de l'historique des réseaux de neurones modèles et d'un aperçu de la théorie sous-jacente (section IV.1), nous détaillons l'implémentation pratique de réseaux de neurones convolutifs pour l'analyse des données MESI (sections IV.2 et IV.3). Nous proposons cette approche comme alternative à la méthode d'ajustement non-linéaire habituellement utilisée pour l'estimation du débit sanguin à partir des images de contraste speckle.



L'**intelligence artificielle** est un ensemble d'algorithmes permettant la résolution de problèmes plus ou moins complexes.

L'**apprentissage automatique** est un ensemble d'algorithmes statistiques où l'ordinateur apprend à partir des données. Il utilise des techniques telles que la régression, la classification et la reconnaissance de formes pour extraire des connaissances exploitables des données.

L'**apprentissage profond** utilise des réseaux de neurones artificiels profonds pour apprendre et extraire des représentations hiérarchiques à partir des données. Les algorithmes sont conçus pour apprendre automatiquement des caractéristiques complexes des données, avec une intervention humaine généralement limitée.

Figure IV.1. Intelligence artificielle, apprentissage automatique et apprentissage profond.

1 LES RÉSEAUX DE NEURONES: UNE APPROCHE ANCIENNE EN PLEINE EXPANSION

1.1 DU CERVEAU HUMAIN AUX RÉSEAUX DE NEURONES MODÈLES

De nombreux avantages sont attribuables au cerveau humain par rapport à un ordinateur pour les tâches autres que le calcul. À titre d'exemple, la reconnaissance des visages en conditions d'éclairage faible et la compréhension rapide de la parole dans un environnement bruyant montrent les capacités de discrimination du cerveau humain. Par ailleurs, le cerveau est en perpétuel renouvellement et restructuration notamment via les phénomènes de neurogenèse et de plasticité cérébrale à l'inverse d'un ordinateur dont l'architecture est relativement figée. L'aspect le plus fascinant du cerveau est sa capacité à apprendre. Dans le cerveau humain, il existe des réseaux interconnectés de neurones. Au niveau des connexions, appelées synapses, des signaux électrochimiques sont échangés pour assurer la communication entre les neurones et les différentes zones cérébrales. Les réseaux neuronaux numériques se sont inspirés des modèles de traitement sensoriel dans le cerveau humain en imitant les processus de communication des neurones biologiques, afin que le réseau modèle « apprenne » à résoudre une certaine tâche (Figure IV.2). En 1943, McCulloch et al. ont développé un modèle simpliste de réseau de neurones où un neurone est décrit comme un interrupteur qui peut être activé ou désactivé en fonction de l'entrée totale pondérée qu'il reçoit des autres neurones (McCulloch et al., 1943). Dans ce modèle, la force de la connexion interneuronale ou synapse est représentée par un nombre appelé « poids » par lequel l'entrée d'une autre cellule est multipliée. Ces poids peuvent être excitateurs ou inhibiteurs tout comme les connexions synaptiques cérébrales. En termes simples, un neurone modèle reçoit un certain nombre d'entrées et en fait la somme pondérée. Selon le résultat, une sortie est produite, puis propagée à un ou plusieurs autres neurones modèles dans la couche suivante. La propagation du signal se fait de proche en proche depuis la couche d'entrée jusqu'à celle de sortie. Une fois que le critère défini pour l'optimisation du réseau est atteint, celui-ci délivre en sortie une réponse au problème en fonction des données introduites en entrée.

Dans les années 1960, des réseaux de neurones modèles présentant des propriétés similaires à celles du cerveau ont été démontrées. Ainsi, des réseaux de neurones modèles peuvent reconnaître des informations et continuer à fonctionner même si certains neurones sont endommagés. Rosenblatt a montré que des réseaux simples de neurones numériques avec une propagation du signal uniquement vers l'avant, appelés perceptrons, pouvaient apprendre à partir d'exemples, ce qui a suscité un grand intérêt pour ce domaine (Rosenblatt, 1961). Initialement, ces réseaux de neurones ne pouvaient résoudre que des problèmes linéairement séparables ce qui limitait leur utilisation. Néanmoins, l'introduction de la méthode de rétropropagation de l'erreur a montré la capacité des réseaux de neurones modèles à résoudre également des problèmes non linéairement séparables (Rumelhart et al., 1986).

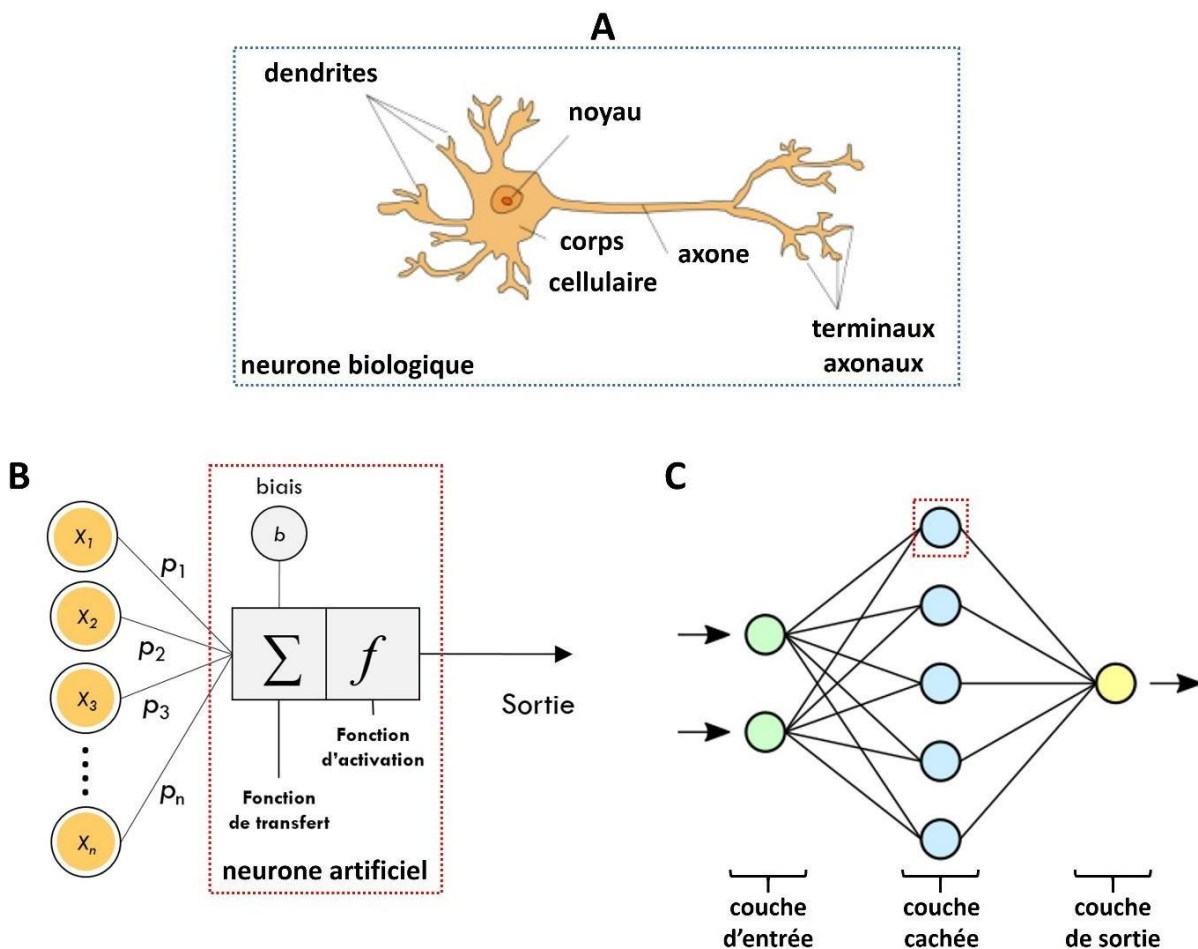


Figure IV.2. Les neurones biologiques et artificiels. (A) Structure d'un neurone biologique. (B) Structure du neurone artificiel. Les neurones artificiels sont notés x_i . Les poids des connexions sont notés p_i . L'encadré rouge correspond aux détails de la structure interne d'un neurone artificiel. (C) Exemple de réseau de neurones avec 1 couche d'entrée, 1 couche cachée et 1 couche de sortie.

L'emploi des réseaux de neurones a connu une évolution significative depuis leur introduction dans les années 1950. Jusqu'aux dernières décennies, la limitation principale à leur développement était la puissance de calcul nécessaire pour entraîner ces réseaux. Des progrès ont d'abord été réalisés avec l'algorithme de rétropropagation, et, depuis les années 2000, l'augmentation massive de la puissance de calcul associée à la disponibilité de grandes quantités de données numériques a mené à des avancées considérables. De nos jours, les réseaux de neurones sont présents dans de nombreux domaines tels que la vision par ordinateur, la reconnaissance de la parole, l'analyse de la structure de protéines, la conception des médicaments, ainsi qu'en imagerie médicale.

1.2 ARCHITECTURES DES RÉSEAUX DE NEURONES POUR L'APPRENTISSAGE PROFOND

Les principales architectures pour l'apprentissage profond sont les réseaux de neurones récurrents, les réseaux de neurones récurrents et les réseaux de neurones convolutifs (pour revue, Alzubaidi et al., 2021).

Les réseaux de neurones récurrents sont capables de représenter des séquences temporelles, ce qui les rend utiles pour les tâches de traitement du langage naturel vu la nature séquentielle des données linguistiques (i.e. les phrases et les paragraphes) (Figure IV.3.A). Un modèle codeur-décodeur pour la traduction automatique est un exemple de réseaux récurrents. Dans ce scénario, l'encodeur reçoit une phrase dans la langue d'origine et le décodeur produit la traduction dans la langue cible. Bien que le nombre de mots dans chaque phrase puisse varier, un réseau récurrent traite une séquence jusqu'à ce qu'il atteigne le dernier mot, quelle que soit la longueur de la séquence. Du fait de leur nature séquentielle, ces réseaux peuvent être lents à entraîner. De plus, ils peuvent rencontrer des difficultés à traiter les dépendances à long terme dans les séquences, dans le cas où deux éléments complémentaires de la séquence sont éloignés l'un de l'autre. Par ailleurs, ce type de réseau peut souffrir du problème de la disparition de gradient ou « vanishing gradient » qui peut conduire dans le cas extrême à stopper l'apprentissage (cf. section IV.2.3).

Les réseaux de neurones récurrents sont une expansion des réseaux récurrents (Figure IV.3.B). Grâce à leur structure arborescente, ils peuvent apprendre les modèles hiérarchiques, contrairement aux réseaux récurrents qui ne peuvent traiter que des données séquentielles. Ce type de réseau est très efficace pour analyser des structures de forme aléatoire, comme les graphes ou les arbres. La structure arborescente des réseaux récurrents repose sur l'existence de connexions qui se ramifient et se rejoignent à différents niveaux. Cela permet au réseau de modéliser des dépendances à longue distance entre les séquences d'entrée. Les réseaux récurrents sont souvent employés pour la reconnaissance de la parole, la génération de texte et la reconnaissance de formes. Dans le contexte de la génération de texte, les réseaux récurrents sont utilisés pour générer un arbre syntaxique à partir d'une séquence de mots. Cet arbre syntaxique représente la structure grammaticale de la phrase. Le réseau récurrent calcule une paire probable de scores pour la fusion (ou la combinaison) des mots de la séquence. Les scores représentent la probabilité que ces fusions soient correctes. Une fois que les fusions ont été effectuées, le réseau récurrent construit un arbre syntaxique en reliant les unités fusionnées de manière hiérarchique. Cet arbre représente la structure du texte complet, où chaque nœud de l'arbre correspond à une unité fusionnée. Enfin, le réseau récurrent attribue une étiquette à la classe correspondante à la séquence traitée. Cette étiquette peut représenter le sentiment d'une phrase, une catégorie grammaticale, une intention de l'utilisateur, etc.

Les réseaux de neurones convolutifs, ou CNN, sont couramment utilisés pour des tâches telles que le traitement d'images, la détection de formes et la segmentation d'images (Figure IV.3.C). Un réseau célèbre, le réseau Alex-Net, a été entraîné pour la classification d'images avec une base de

données de plus d'un million d'images de la base publique ImageNet (Deng et al., 2009). Les CNN peuvent automatiquement extraire les caractéristiques pertinentes (ou « features ») des images sans aucune supervision humaine. Ils présentent plusieurs avantages par rapport aux autres types de réseaux de neurones: (i) ils utilisent des connexions locales et des poids partagés pour simplifier et accélérer le processus d'entraînement ce qui améliore la généralisation du réseau et minimise le surajustement (cf. section IV.3.1); (ii) l'apprentissage simultané de la couche d'extraction de caractéristiques et de la couche de classification fait que la sortie du réseau est fortement dépendante des caractéristiques extraites; et (iii) l'implémentation de réseaux à grande échelle (i.e. grande quantité de données, système complexe à multi-composants interconnectés) est beaucoup plus facile avec les CNN qu'avec d'autres réseaux de neurones (Alzubaidi et al., 2021). Parmi les CNN, il existe différentes architectures et usages. En particulier, les CNN multicanaux comportant plusieurs canaux d'entrée, chacun correspondant à un type de caractéristique d'entrée différent comme, par exemple, des niveaux de contraste, des formes, des textures ou d'autres aspects de l'image. Les CNN avec des couches résiduelles permettent des architectures plus profondes en résolvant le problème de la disparition du gradient (cf. section IV.2). Enfin, les CNN récurrents combinent des couches convolutives avec des réseaux de neurones récurrents pour effectuer des tâches de reconnaissance d'objets dans des vidéos et des séquences d'images. Il existe d'autres types de CNN spécialisés pour des tâches particulières ou qui combinent différentes architectures de réseaux de neurones. Les GAN pour « Generative Adversarial Network » utilisent deux réseaux de neurones, un générateur et un discriminateur. L'objectif ultime d'un GAN est d'atteindre un équilibre où le générateur est capable de générer des données indiscernables des données réelles, et où le discriminateur a du mal à faire la distinction entre les deux types de données. En règle générale, le choix d'un type de CNN s'appuie sur la tâche à effectuer et les caractéristiques des données d'entrée. Pour les avantages déjà mentionnés des CNN, nous avons implémenté des réseaux CNN multicouches avec des connexions résiduelles; ce type de réseaux est bien adapté à l'analyse des images MESI pour l'extraction des cartes de débit sanguin.

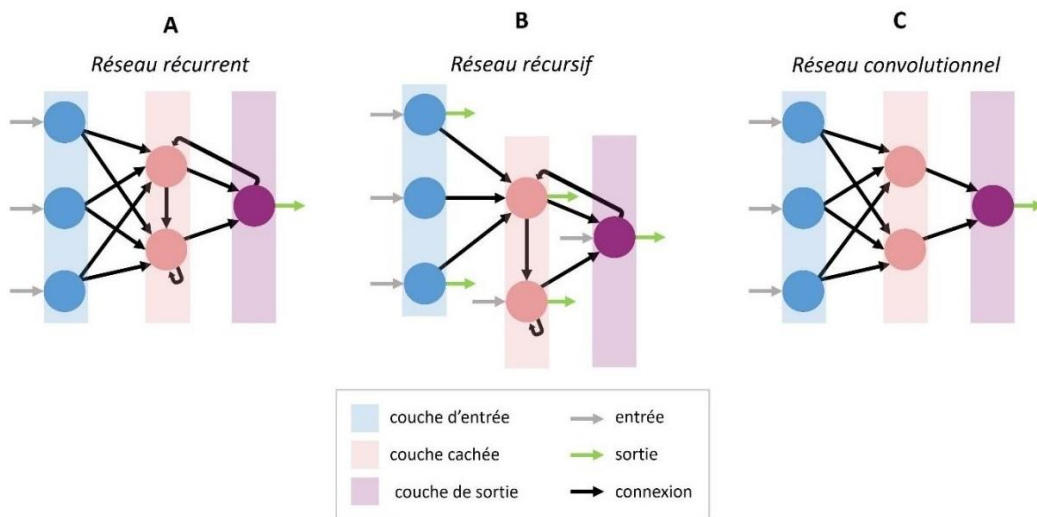


Figure IV.3. Schéma représentatif de l'architecture des différents types de réseaux de neurones. (A) Réseau de neurones récurrent. Les réseaux récurrents sont caractérisés par les connexions récurrentes d'une couche

à la couche précédente ou à l'intérieur d'une même couche. (B) Les réseaux de neurones récurrents utilisent également des connexions récurrentes associées à une structure arborescente: dans la couche cachée, le neurone supérieur possède trois ramifications (branches) dans la couche d'entrée tandis que le neurone inférieur n'en a aucune. (C) Les réseaux de neurones convolutifs utilisent un apprentissage « feed-forward ». L'information se propage de manière unidirectionnelle, de la couche d'entrée à la couche de sortie, sans rétroaction directe.

1.3 DIFFÉRENTES APPROCHES D'APPRENTISSAGE DES RÉSEAUX DE NEURONES

Les réseaux de neurones peuvent apprendre de différentes manières. Dans l'apprentissage supervisé, le réseau est entraîné à partir d'un ensemble de données annotées, où chaque exemple d'entraînement est associé à une sortie cible dont les caractéristiques sont connues. Le réseau apprend à généraliser ces correspondances et à prédire les sorties correctes pour de nouvelles entrées non annotées (Alzubaidi et al., 2021). À l'inverse, dans l'apprentissage non supervisé, aucune sortie cible n'est prédéfinie et le réseau explore les données non annotées pour découvrir des structures et des motifs cachés. L'apprentissage non supervisé inclut des tâches telles que la détection de similarités et le regroupement des données. Un autre type d'apprentissage est l'apprentissage par renforcement. Cette technique a été introduite en 2013 par Google Deep Mind (Mnih et al., 2015). Dans ce cas, le réseau de neurones apprend à prendre des décisions en interagissant avec un environnement. Le réseau reçoit des « récompenses » ou des « punitions » basées sur ses actions, ce qui lui permet d'ajuster ses stratégies pour maximiser les récompenses à long terme (Wiering et al., 2012). Par ailleurs, dans l'apprentissage semi-supervisé, le réseau de neurones utilise à la fois des données annotées et non annotées pour apprendre. Cela permet d'exploiter efficacement de grandes quantités de données non annotées tout en bénéficiant de la supervision pour guider l'apprentissage (Hady et al., 2013). Enfin, l'apprentissage par transfert consiste à utiliser les connaissances acquises par un réseau de neurones sur une tâche pour aider à résoudre une autre tâche similaire. Ainsi le réseau transfère les connaissances apprises pour accélérer l'apprentissage sur la nouvelle tâche (Tan et al., 2018). En résumé, plusieurs approches d'apprentissage existent et le choix du type d'apprentissage dépend de plusieurs facteurs tels que la disponibilité des données, l'objectif de l'apprentissage (i.e. maximisation des récompenses, extraction de connaissances préalables, régression linéaire, classification, etc.), la complexité du problème et les ressources disponibles (par exemple, l'annotation manuelle des données exige un effort et un temps non négligeables et peut poser des problèmes de fiabilité). Pour notre application, nous cherchons à implémenter un réseau de neurones pour inférer une image du débit sanguin à partir d'images de contraste speckle à plusieurs temps d'exposition. À cet effet, nous avons choisi de réaliser un apprentissage supervisé à partir d'une base de données annotées obtenues expérimentalement par imagerie speckle de canaux microfluidiques pour des dimensions et débits contrôlés, représentatifs de la physiologie cérébrale *in vivo*.

1.4 APPRENTISSAGE SUPERVISÉ PAR RÉTROPROPAGATION DES ERREURS: PRINCIPES D'IMPLÉMENTATION

En mode d'apprentissage supervisé et dans le cas d'un problème de régression, le réseau de neurones est très souvent entraîné en utilisant l'algorithme de rétropropagation des erreurs. Cet algorithme permet d'ajuster les poids des connexions entre les neurones de manière à minimiser l'erreur de prédiction du modèle. L'algorithme de rétropropagation des erreurs peut être résumé en plusieurs étapes: (i) les poids du réseau de neurones sont initialisés de manière aléatoire; (ii) les données d'entrée sont propagées à travers le réseau de neurones en utilisant les poids actuels. Chaque neurone calcule une combinaison linéaire de ses entrées pondérées par les poids correspondants, puis applique une fonction d'activation (cf. section IV.2.4) pour produire la sortie; (iii) l'erreur de prédiction est calculée en comparant la sortie prédite avec la sortie cible. Cette erreur est ensuite rétropropagée à travers le réseau de neurones de la dernière couche du réseau vers la première couche, en calculant le gradient de l'erreur par rapport aux poids de chaque neurone; (iv) les poids sont mis à jour en utilisant la règle de descente de gradient pour minimiser l'erreur. Cette règle ajuste les poids dans la direction opposée du gradient de l'erreur multiplié par un taux d'apprentissage λ , choisi par l'utilisateur. Les étapes (ii) à (iv) sont répétées pour chaque exemple d'entraînement, jusqu'à ce que la condition de convergence choisie par l'utilisateur soit satisfaite.

Considérons l'exemple simple d'un réseau de neurones contenant une couche d'entrée, une seule couche cachée et une couche de sortie (Figure IV.4).

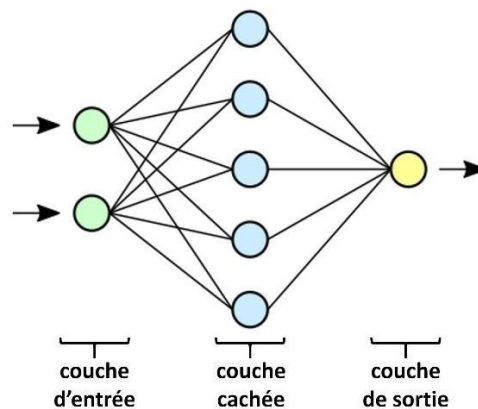


Figure IV.4. Réseau de neurones à une couche cachée.

Soit le couple $\{x(n), c(n)\}$ désignant la $n^{\text{ème}}$ donnée d'entraînement du réseau où $x(n)$ et $c(n)$ correspondent respectivement aux vecteurs d'entrée et de sortie cible du système. L'algorithme de rétropropagation des erreurs consiste à mesurer l'erreur entre la sortie cible $c(n)$ et la sortie observée $y(n)$ résultant de la propagation vers l'avant de l'entrée $x(n)$, et à propager de la sortie vers l'entrée (stratégie appelée « rétropropagation ») cette erreur à travers les couches du réseau. Pour des raisons de simplification, nous supposons ici, que la couche de sortie compte un seul

neurone. L'algorithme de rétropropagation procède à l'adaptation des poids, neurone par neurone, en commençant par la couche de sortie. Considérons le neurone de la couche de sortie. Soit $e(n)$ l'erreur observée pour la $n^{\text{ème}}$ donnée d'entraînement:

$$e(n) = c(n) - y(n) \quad (\text{Équation IV.1})$$

L'objectif de l'algorithme est d'adapter les poids des connexions du réseau de manière à minimiser la somme des erreurs sur tous les neurones de sortie; dans notre exemple, ceci revient à minimiser $e(n)$. La sortie $y(n)$ du neurone de la couche de sortie est définie par:

$$y(n) = f[s(n)] = f\left[\sum_{i=1}^m p_i(n)y_i(n)\right] \quad (\text{Équation IV.2})$$

où f est la fonction d'activation du neurone, s est la somme pondérée des entrées du neurone de sortie, $p_i(n)$ est le poids de la connexion entre le neurone i de la couche cachée et le neurone de la couche de sortie, et $y_i(n)$ est la sortie du neurone i . Nous supposons que la couche cachée contient m neurones. L'algorithme de la descente de gradient est utilisé pour minimiser l'erreur d'apprentissage $e(n)$. Il modifie de manière itérative les poids du réseau à chaque période d'apprentissage. Plus précisément, pour mettre à jour les poids, il calcule le gradient de l'erreur en appliquant une dérivée de premier ordre par rapport aux poids du réseau. Par conséquent, il suffit de modifier les poids $p_i(n)$ dans le sens opposé au gradient de l'erreur $\frac{\partial e(n)}{\partial p_i(n)}$. Pour la couche

cachée, il y a m poids à ajuster en fonction des gradients associés à chaque connexion. En passant par le théorème de dérivation des fonctions composées (cf. Alzubaidi et al., 2021; et Rojas, 1996 pour un exemple plus généralisé), la mise à jour du poids de la connexion entre le neurone i de la couche cachée et le neurone de la couche de sortie se fait par:

$$\Delta p_i(n) = -\lambda \frac{\partial e(n)}{\partial p_i(n)} = \lambda \delta(n) y_i(n) \quad (\text{Équation IV.3})$$

où λ représente le taux d'apprentissage du réseau et $\delta(n) = e(n)y(n)[1 - y(n)]$ (Équation IV.4) le gradient local. Le taux d'apprentissage est défini comme la taille du pas de la mise à jour des poids. Une fois que la modification des poids est faite pour les connexions entre la couche cachée et la couche de sortie, la rétropropagation de l'erreur se poursuit afin de modifier les poids des liaisons entre la couche cachée et la couche d'entrée. L'objectif est toujours d'adapter les poids de la couche courante en minimisant l'erreur sur le neurone de la couche de sortie. Dans ce cas, le gradient de l'erreur s'écrit:

$$\frac{\partial e(n)}{\partial p_{(i-1)i}(n)} = -y_i(n)[1 - y_i(n)][\delta(n)p_i(n)]y_i(n) \quad (\text{Équation IV.5})$$

où $i-1$ correspond à l'indice du neurone de la couche d'entrée. Par suite, la mise à jour du poids de la connexion entre un neurone de la couche d'entrée $i-1$ et un neurone de la couche caché i s'écrit:

$$\Delta p_{(i-1)i}(n) = \lambda \delta_{i-1}(n) y_{i-1}(n) \quad (\text{Équation IV.6})$$

$$\text{où } \delta_i(n) = y_i(n)[1 - y_i(n)][\delta(n)p_i(n)] \quad (\text{Équation IV.7})$$

Une fois que tous les poids du réseau sont ajustés, les sorties observées sont recalculées avec les nouveaux poids, en propageant les entrées, cette fois vers l'avant du réseau. Chaque cycle de

propagation vers l'avant suivi d'une rétropropagation constitue une période d'apprentissage ou « époque » (Alzubaidi et al., 2021; Rojas, 1996). L'algorithme est répété autant d'époques que nécessaire pour atteindre le seuil de convergence défini par l'utilisateur, c'est-à-dire la valeur minimale à atteindre pour la fonction de coût. La fonction coût (ou fonction objective) est une mesure mathématique qui évalue à quel point les prédictions d'un modèle sont éloignées des valeurs réelles attendues. Elle quantifie l'écart entre les prédictions du modèle et les valeurs cibles, et fournit ainsi une indication de la qualité de la prédiction. L'erreur quadratique moyenne (EQM) est souvent utilisée comme fonction coût pour les problèmes de régression. Pour la classification, d'autres métriques sont employées telle que l'entropie.

1.5 LES RÉSEAUX DE NEURONES EN IMAGERIE BIOMÉDICALE EN 2023

L'utilisation de l'apprentissage automatique est en croissance rapide en imagerie médicale. Elle répond au besoin croissant de traiter des quantités massives de données de manière rapide et automatisée avec précision. Entre les années 1996 et 2020, et surtout dans les dernières années, une très importante croissance du nombre de publications sur l'apprentissage automatique en biologie et médecine est observée (Walsh et al., 2021).

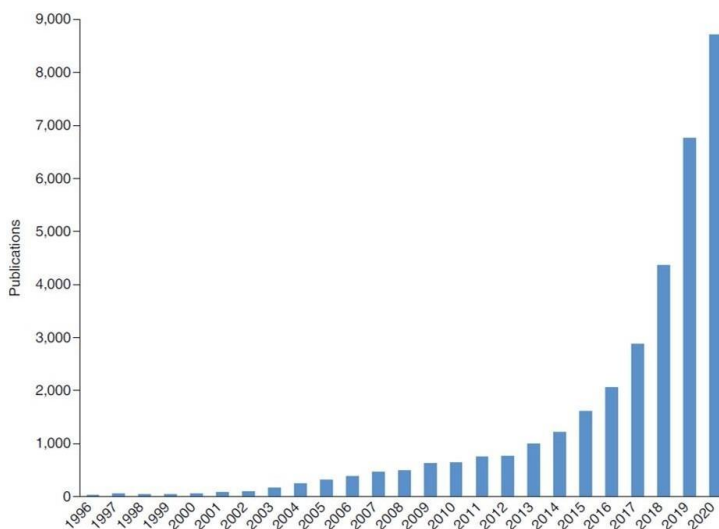


Figure IV.5. Augmentation des publications en lien avec l'apprentissage automatique dans le domaine biomédical. (Walsh et al., 2021)

La médecine est en passe de devenir un des domaines d'application les plus importants de l'intelligence artificielle et de l'apprentissage automatique. L'intelligence artificielle pourrait en particulier aider les professionnels de santé en ajoutant un jugement « objectif » dans l'analyse des données médicales. Les premiers exemples d'utilisation des réseaux de neurones en imagerie médicale datent de la fin du 20^{ème} siècle. De très nombreuses applications de l'apprentissage automatique en médecine sont en cours de validation ou pour les plus avancées de déploiement

pour l'identification et la classification des pathologies, le classement des risques liés aux maladies, la sélection de traitements appropriés ou la surveillance de l'évolution des maladies. La complexité des problèmes et des enjeux a poussé de nombreux développements dans ce domaine et diverses méthodes d'apprentissage automatique sont utilisées dans le domaine biomédical telles les réseaux de neurones artificiels (ANN), les réseaux de neurones à convolution (CNN) et les algorithmes évolutionnaires d'optimisation (Rahmani et al., 2021).

Malgré des avancées prometteuses en imagerie médicale, plusieurs défis doivent être relevés pour garantir un déploiement sûr des modèles. La validation est un défi considérable: les modèles d'IA sont polyvalents et peuvent effectuer des tâches inédites. Les développeurs ainsi que les régulateurs doivent en particulier assurer la transparence des tests et la définition des applications pour lesquelles l'utilisation est approuvée. L'intégration de techniques d'explicitation (i.e. cartographie des activations, perturbation des entrées) peut contribuer à garantir l'exactitude et l'interprétabilité des résultats. Il est également crucial de mettre en évidence les risques de biais dans le modèle informatique et les bases d'entraînement. La qualité et l'exhaustivité des annotations dans les données d'entraînement peuvent influencer sur la performance des modèles. De nombreuses études soulignent ainsi les risques d'une sous-performance sur des populations spécifiques et la nécessité d'un audit continu pour traiter les biais qui peuvent apparaître dans de nouvelles tâches et de nouveaux contextes. Par ailleurs, les enjeux concernant la protection de la vie privée sont une préoccupation importante, car les réseaux de neurones ont accès à un large éventail de données sensibles. L'anonymisation des données et la limitation des informations collectées réduisent les risques pour la vie privée. L'échelle de ces modèles pose également des questions en termes de coût, d'impact environnemental et de collecte de données. Le déploiement des systèmes d'IA pose aussi des soucis techniques, en particulier dans des environnements médicaux qui peuvent nécessiter une réduction de la complexité des modèles dégradant potentiellement leurs performances. En résumé, si les modèles d'IA offrent des possibilités d'amélioration des soins de santé, ils sont également confrontés à des défis liés à la validation, à la vérification, aux biais d'apprentissage, à la protection de la vie privée des patients, à l'évolutivité et au déploiement. Il est essentiel de relever ces défis pour une utilisation sûre et efficace de l'IA dans la pratique médicale (pour revue sur l'IA en médecine, Rajpurkar et al., 2022; Moor et al., 2023).

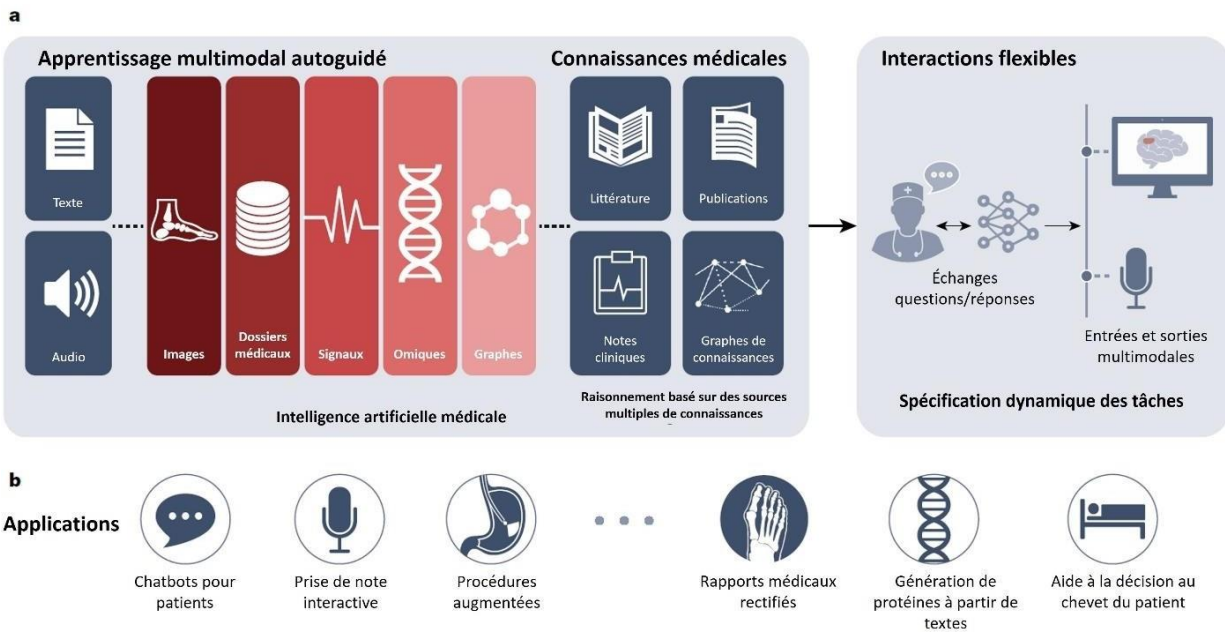


Figure IV.6. Vue d'ensemble d'un pipeline potentiel de modèles d'intelligence artificielle médicale. (a) Un modèle d'IA est entraîné sur plusieurs modalités de données médicales, grâce à des techniques telles que l'apprentissage supervisé ou auto-supervisé. Pour enrichir l'échange « professionnel de santé-patient », les modalités de données telles que les images ou les données des dossiers médicaux électroniques peuvent être associées au langage, sous forme de texte ou de données vocales. Ensuite, le modèle peut accéder à diverses sources numériques de connaissances médicales pour effectuer des tâches de raisonnement médical, débloquent ainsi une multitude de capacités qui peuvent être utilisées dans des applications en aval. Le modèle d'IA médicale généraliste qui en résulte exécute alors des tâches que l'utilisateur peut spécifier en temps-réel. Pour ce faire, le modèle récupère des informations contextuelles à partir de sources telles que des graphes de connaissances ou des bases de données, en s'appuyant sur des connaissances médicales formelles pour raisonner sur de nouvelles tâches. (b) Exemples d'applications cliniques potentielles de l'IA, chacune nécessitant une validation et une évaluation réglementaire minutieuses. (Adaptée de Moor et al., 2023)

1.6 ÉTAT DE L'ART DE L'APPLICATION DES RÉSEAUX DE NEURONES EN IMAGERIE DU CONTRASTE SPECKLE DYNAMIQUE

Dans les dernières années, l'apprentissage automatique a commencé à être implémenté pour les applications d'imagerie speckle. Par exemple, les CNN ont été associés à l'imagerie speckle pour la classification de cellules cancéreuses de la peau par mesure statistique sur les courbes de distribution des grains de speckle (Wang et al., 2021) et pour la segmentation automatique de zones ischémiques dans les intestins en imagerie speckle peropératoire (Wang et al., 2022). Pour l'analyse des données MESI, le groupe de Marcus Larsson, à l'Université de Linköping en Suède, a proposé (en amont du présent travail de thèse) l'utilisation des réseaux de neurones pour implémenter la « régression des données » et contourner l'étape d'ajustement non-linéaire pixel par pixel, particulièrement lourde en temps de calcul. L'approche proposée s'est basée sur des données de contraste MESI simulées à partir de l'équivalence entre les données laser Doppler et les données

speckle, mise en évidence par le même groupe (Fredriksson et al., 2019; Hultman et al., 2023). L'application *in vivo* de l'étude consistait en l'imagerie d'une hyperémie post-occlusive. Un brassard gonflant bloque temporairement la macrocirculation. Lorsque la pression du brassard est relâchée, nous observons par imagerie MESI le retour progressif du flux post-occlusion dans le doigt. Le protocole suivi consiste en 5 minutes d'occlusion suivi de 5 minutes de reperfusion. Les images acquises ont une résolution spatiale faible, environ 200 μm par pixel (1024 x 1020 pixels pour un champ de vue 20 x 20 cm^2), et ne permettent pas de résoudre des vaisseaux sanguins (Fredriksson et al., 2019). Par ailleurs, le protocole d'occlusion en « tout ou rien » est grossier et peu représentatif des changements subtils de la microcirculation dont l'évaluation exige une résolution spatiotemporelle plus fine. À titre de comparaison, le dispositif d'imagerie MESI développé lors de la thèse d'Haleh Soleimanzad (Soleimanzad, 2018) et validé *in vivo* sur le cortex de souris (Soleimanzad et al., 2019) permet l'imagerie des vaisseaux jusqu'à environ 10 μm de diamètre minimum avec 1920 x 1440 pixels de 3.63 μm de côté, associé à un champ de vue de 2 x 1.5 mm^2 .

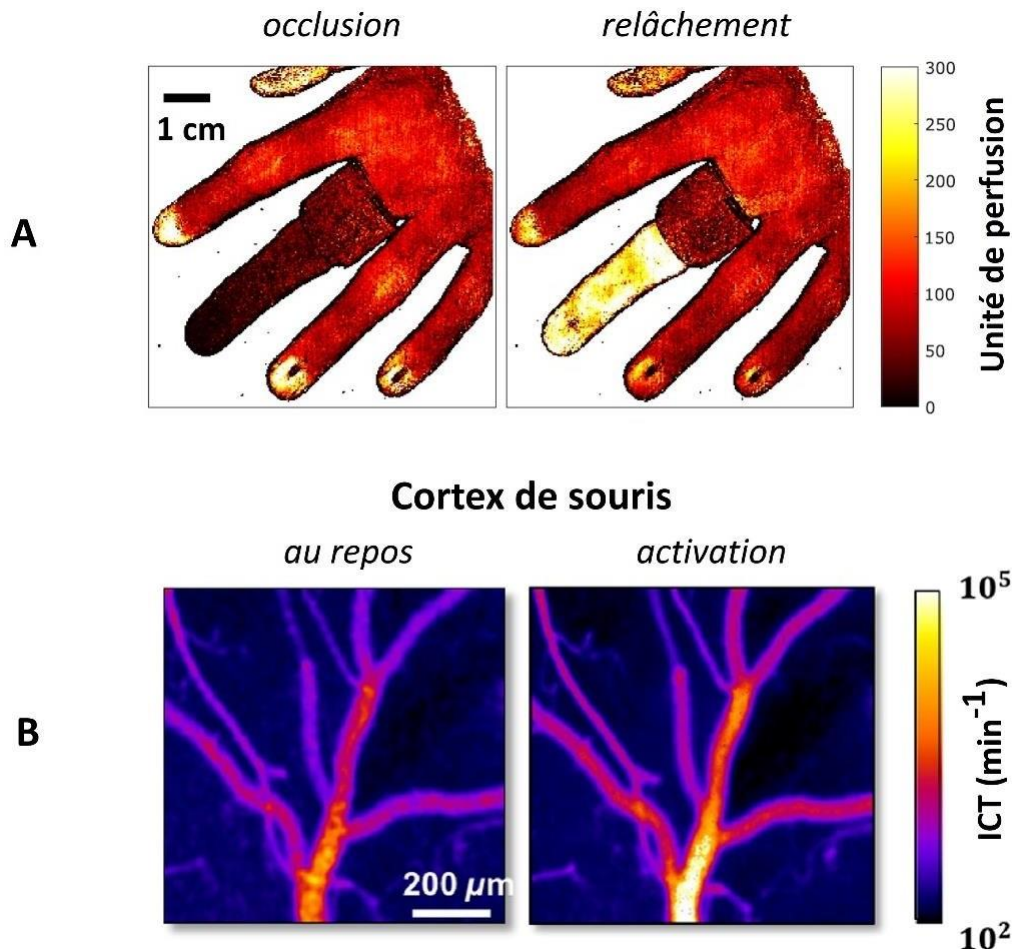


Figure IV.7. Cartes de perfusion sanguine dérivées des données MESI. (A) Les images représentent une provocation occlusion-relâchement d'un doigt (adaptée de Fredriksson et al., 2019). (B) Cartes représentatives de l'ICT cortical au repos et après une activation sensorielle chez la souris (adaptée de Soleimanzad et al., 2019).

De façon surprenante, les études de l'Université de Linköping, ont mis en œuvre un réseau de type ANN, alors que les CNN sont en théorie censés être intrinsèquement plus performants pour l'analyse d'images en raison de leur capacité à extraire automatiquement des caractéristiques locales pertinentes (Yu et al., 2021). Par ailleurs, le réseau développé ne possède qu'une seule couche cachée, ce qui permet une grande rapidité d'entraînement et d'inférence des données de sortie au détriment de la précision des prédictions. Une autre étude récente, en S-LSCI s'est focalisée sur la détection automatisée de flux par analyse de données speckle (Stebakov et al., 2021). Ici aussi un réseau ANN sans convolution a été utilisé, mais avec six couches cachées. L'entraînement a été réalisé par des images expérimentales obtenues sur un capillaire en verre de large diamètre (1.6 mm). Plusieurs approches pour le calcul du contraste speckle ont été évaluées (spatial, temporel, spatiotemporel et spatial moyenné). Le réseau a montré une bonne capacité à identifier le flux avec précision, néanmoins l'approche était une approche de classification du flux par le réseau dans différentes classes de valeurs discrètes, alors que le flux est une variable physiologique continue. L'étude est également limitée, d'une part, par la dimension unique et non physiologique (en termes de microcirculation) du canal utilisé et, d'autre part, par l'absence de validation sur des images biologiques. Enfin, une étude s'appuyant comme notre approche sur un réseau CNN a été menée en parallèle de mes travaux. L'objectif est cependant différent puisqu'il vise à réaliser par apprentissage l'extrapolation de données S-LSCI en données MESI (Hao et al., 2023). Dans cette approche intéressante, les données d'entraînement sont des données expérimentales obtenues sur un disque peint à l'aide d'un matériau diffusant rugueux dont la vitesse de rotation est contrôlée. Les images d'apprentissage sont donc des données homogènes, sans structure et dont la nature est sensiblement différente des images speckle produite par un flux de diffuseurs mobiles dans un fluide visqueux. Le Tableau IV.1 ci-dessous résume les approches par réseaux de neurones publiées par différents groupes pour l'analyse des données de contraste speckle dynamique.

	Fredriksson et al., 2019 Hultman et al., 2023	Stebakov et al., 2021	Hao et al., 2023
Modalité d'imagerie speckle	MESI	S-LSCI	S-LSCI
Temps d'exposition	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ms	5, 15, 33 ms	10.4 ms
Nombres d'images par seconde	1000	30	100
Type de données d'entraînement	Simulées avec ajout de bruits	Expérimentales (capillaire en verre de 1.6 mm; intralipide-2%)	Expérimentales (rotation d'un disque peint)
Type de réseau de neurones	ANN	ANN	CNN
Nombre de couches cachées	1	1	6
Sortie du réseau	Carte de perfusion LDF (unité de perfusion)	Carte de contraste (K)	Carte de vitesse (mm/s)
Fonction d'activation dans les couches cachées	$F(x) = \frac{\text{Tanh } x}{\frac{e^x - e^{-x}}{e^x + e^{-x}}}$	$F(x) = \text{ReLU}$	$F(x) = \text{ReLU}$
Fonction d'activation dans la couche de sortie	$F(x) = x$	$F(x_i) = \frac{e^{x_i}}{\sum_{j=1}^K e^{x_j}}$ pour $i = 1, \dots, K$ et $x = (x_1, \dots, x_k) \in \mathbb{R}^K$	$F(x) = \text{ReLU}$
Validation <i>in vivo</i>	Oui	Non	Non

Tableau IV.1. Tableau comparatif des approches par réseaux de neurones adoptées par différentes études pour l'analyse des données speckle.

L'idée que nous avons poursuivie dans la thèse était d'aller vers une analyse rapide des données MESI en tirant partie de l'approche par réseaux de neurones. En effet, la difficulté de pouvoir analyser des données MESI en quelques secondes sur un champ de vue large est un des verrous méthodologiques à lever pour envisager l'emploi de la technique MESI en milieu clinique. Nous avons évalué les performances des réseaux de type CNN par rapport à l'approche d'ajustement non-linéaire pour l'extraction des cartes de flux sanguin à partir des données MESI. Plusieurs architectures ont été développées et évaluées et sont détaillées dans la section 2 de ce chapitre. La partie 3 présentera la méthode suivie pour l'entraînement des réseaux. Dans la partie 4 nous comparons les performances des différentes architectures entre elles ainsi qu'avec la méthode « gold standard » d'estimation des cartes de débit par régression non-linéaire sur le modèle MESI.

2 ARCHITECTURE DES RÉSEAUX CONVOLUTIFS DEVELOPPÉS PENDANT LA THÈSE

Dans le but d'extraire les cartes de débit sanguin à partir des images de contraste MESI acquis à différents temps d'exposition, nous avons développé, dans le cadre d'une collaboration internationale (Programme Hubert Curien Orchid MESI-ML) avec Hsin-Hon Lin et Chao-Yueh Yu de l'Université Chang Gung à Taiwan, deux architectures CNN résiduelles. La première, appelée MSR-Net, s'appuie sur un réseau de neurones résiduels à canaux multiples. La seconde, appelée Res3D-Net, est constituée d'un réseau de neurones résiduel tridimensionnel. Ces deux approches convolutives sont basées sur la détection automatique des caractéristiques spatiales et des informations de corrélation entre les images acquises à différents temps d'exposition. Les deux architectures qui sont détaillées dans les paragraphes suivants sont présentées sur les Figures IV.8 et IV.9.

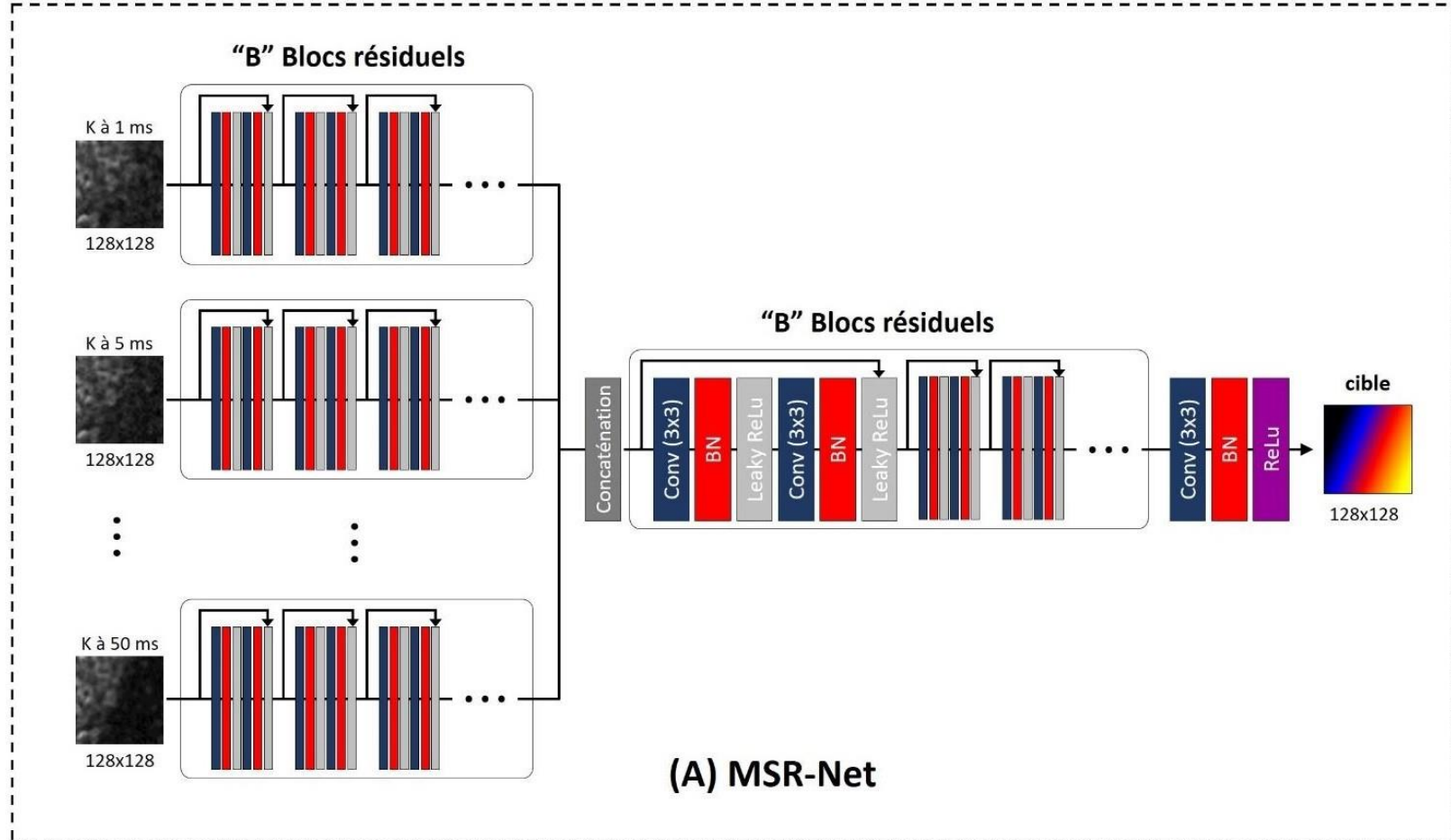


Figure IV.8. Architecture du réseau convolutif « Multiple Stream Residual Neural Network » (MSR-Net). Chaque canal reçoit en entrée un patch de 128 x 128 pixels extrait d'une carte de contraste speckle K pour un temps d'exposition donné (de 1 à 50 ms). En bleu couche de convolution 2D 3 x 3, en rouge couche de BN (Batch Normalization), en gris couche de fonction d'activation. Chaque bloc résiduel B est constitué d'une succession séquentielle de ces structures. Les sorties de chaque canal sont concaténées pour arriver à une seule image de sortie qui correspond à l'image du flux.

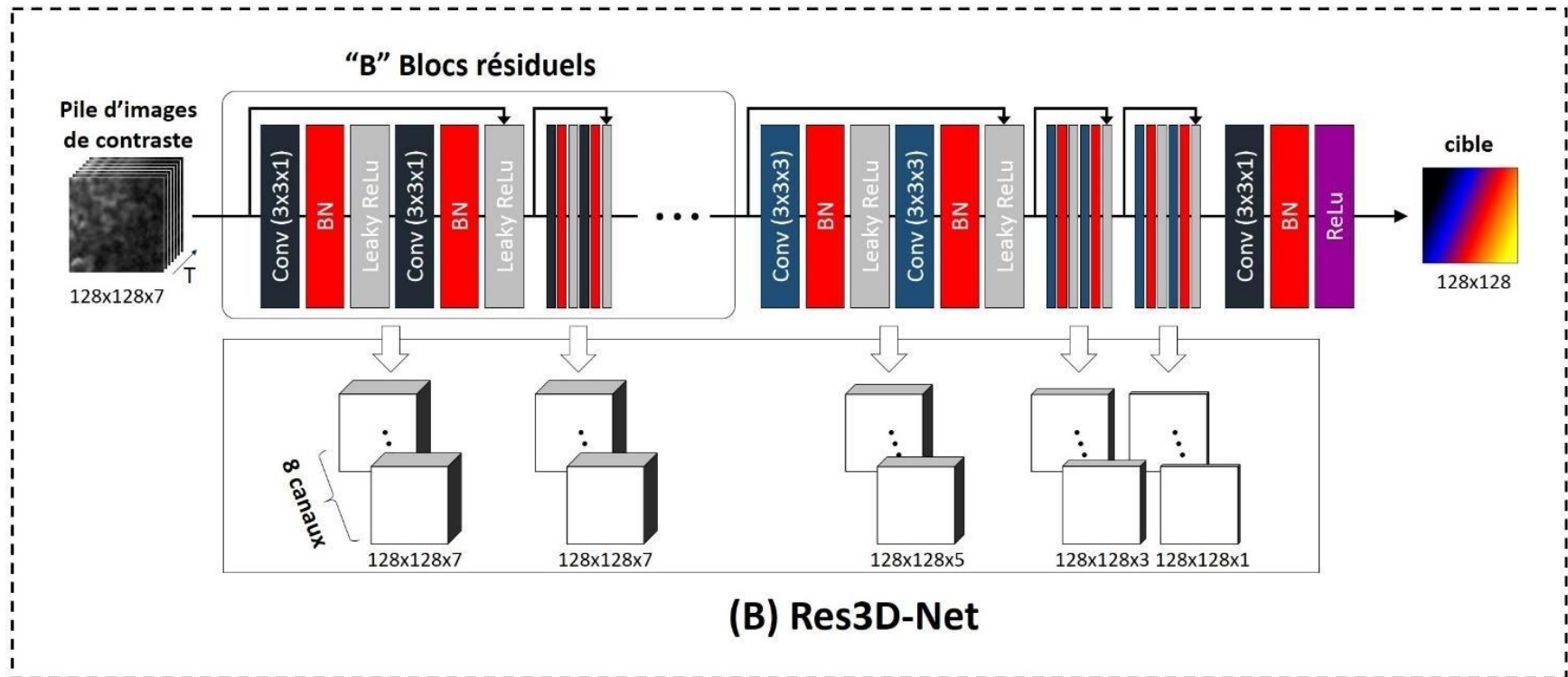


Figure IV.9. Architecture du réseau convolutif « Residual 3-Dimensional Neural Network » (Res3D-Net). Une pile de sept patches de contraste de 128 x 128 pixels correspondant à sept temps d'exposition (de 1 à 50 ms) est injectée en entrée du réseau. En bleu couche de convolution 2D 3 x 3 x 1, en rouge couche de BN, en gris couche de fonction d'activation. Chaque bloc résiduel B est constitué d'une succession séquentielle de ces structures. À la sortie des B blocs résiduels, la pile d'images passe dans trois blocs résiduels; la 3^{ème} dimension de la pile de patches diminue de deux après le passage dans chaque bloc allant de 128 x 128 x 5 au 1^{er} bloc jusqu'à 128 x 128 x 1 au 3^{ème} bloc. Ceci permet la concaténation des caractéristiques des patches aux différents temps d'exposition et d'aboutir finalement à une image bidimensionnelle du flux.

2.1 RÉSEAU RÉSIDUEL MULTICANAUX: MSR-NET

La Figure IV.8 montre l'architecture du réseau résiduel à canaux multiples (MSR-Net pour « Multiple Stream Residual Neural Network »), qui est divisé en sept sous-canaux, chacun correspondant à un temps d'exposition des images de contraste speckle. Le MSR-Net apprend les combinaisons appropriées de caractéristiques des sept canaux pour prédire la carte de débit finale. Des patches de contraste speckle à un temps d'exposition donnée constituent l'entrée d'un canal. Un patch est une petite sous-région carrée, extraite de l'image d'entrée. Chaque canal du réseau contient B blocs résiduels identiques. Un bloc résiduel est constitué des couches de convolution bidimensionnelles (Conv) (huit noyaux de caractéristiques ou « kernels », un filtre spatial de 3 x 3 pixels avec un pas de 1 et un « padding » de réplication; cf. section III.1.4 pour plus de détails sur le « padding »), suivies d'une normalisation par lots (BN pour « Batch Normalization ») et de la fonction d'activation linéaire « Leaky ReLU » ($\alpha = 0.01$). Pour la couche de sortie uniquement, la fonction d'activation utilisée est une fonction « ReLU ». Nous reviendrons en détail sur les fonctions d'activation dans la section IV.2.4. La BN vise à normaliser les valeurs d'entrée de chaque couche pour qu'elles aient une moyenne nulle et une variance unitaire. Cette étape est essentielle pour accélérer l'apprentissage, améliorer la stabilité de l'entraînement et réduire le risque du surapprentissage (cf. section IV.3.1). Les caractéristiques obtenues à la sortie de chaque canal sont concaténées et transmises au canal de sortie suivant. Une connexion raccourcie à l'intérieur de chaque bloc résiduel est appliquée pour réinjecter l'entrée à la sortie du bloc résiduel et sauter les deux couches de convolution afin d'éviter le problème du « vanishing gradient » (cf. section IV.2.3) (He et al., 2016). Nous avons entraîné ce réseau en augmentant progressivement le nombre B de blocs résiduels afin d'évaluer empiriquement le nombre optimal de blocs qui satisfasse le compromis entre l'extraction effective des caractéristiques des images, la convergence du réseau et le temps nécessaire à l'apprentissage et à l'inférence des sorties.

2.2 RÉSEAU RÉSIDUEL TRIDIMENSIONNEL: RES3D-NET

La Figure IV.9 présente l'architecture du réseau de neurones résiduel à convolution 3D (Res3D-Net pour « Residual 3-Dimensional Neural Network »). L'entrée du réseau est une pile de patches de contraste speckle pour les différents temps d'exposition. Le réseau Res3D-Net est basé sur un bloc résiduel 3D pour apprendre les caractéristiques « espace-temps d'exposition » des données. L'intérêt des réseaux 3D est que leurs couches de convolution extraient les caractéristiques spatiales et temporelles (plusieurs images à différents temps d'exposition) simultanément en utilisant des filtres 3D. Les B premiers blocs résiduels 3D (huit noyaux de caractéristiques, filtre spatial de 3 x 3 x 1 pixels avec un pas de 1 et un « padding » de réplication) servent d'extracteur de caractéristiques spatiales conjointes pour des images de contraste speckle à temps d'exposition multiples. Les fonctions d'activation sont les mêmes que dans le MSR-Net (« Leaky ReLU » pour les couches cachées et « ReLU » pour la couche de sortie). À la fin de l'extracteur, les caractéristiques générées sont ensuite introduites dans trois blocs résiduels « espace-temps d'exposition » (huit noyaux de caractéristiques, filtre de 3 x 3 x 3 pixels avec un pas de 1, un

« padding » de réplication le long de la dimension spatiale et aucun « padding » le long de la dimension du temps d'exposition). Comme nous le voyons sur la Figure IV.9, la stratégie d'absence de « padding » le long de la dimension associée au temps d'exposition permet une extraction progressive des caractéristiques d'exposition tout en aboutissant comme souhaité à une seule carte de débit à partir d'un bloc 3D d'images multi-exposition.

2.3 COMMENT LES ARCHITECTURES CHOISIES PERMETTENT DE GÉRER LE PROBLÈME DE DISPARITION DU GRADIENT ?

Lors de l'étape de rétropropagation des erreurs, un problème majeur est celui de la disparition du gradient « vanishing gradient ». En effet, lors de la mise à jour des poids d'un réseau de neurones, les gradients peuvent devenir très petits rendant la mise à jour des poids difficile, voire impossible. Ce problème est fréquent dans les réseaux de neurones comportant de nombreuses couches, où les gradients sont multipliés plusieurs fois lors de la rétropropagation pour atteindre les couches les plus profondes ce qui peut engendrer une diminution significative de l'amplitude des gradients. Ce phénomène conduit à un ralentissement voire à un arrêt de l'apprentissage du réseau. Les réseaux de neurones résiduels MSR-Net et Res3D-Net mis en œuvre permettent de s'affranchir de ce problème. En effet, dans un réseau qui comporte des neurones résiduels, une connexion de raccourci est installée entre l'entrée et la sortie d'un bloc résiduel par exemple (voir les flèches noires dans les blocs résiduels des Figures IV.8 et IV.9. Cette connexion permet de conserver le gradient de départ et de le passer directement de la couche d'entrée à la couche de sortie, sans être affecté par les multiplications répétées dans les couches intermédiaires. Ainsi le problème de disparition du gradient est minimisé et la convergence du réseau est plus sûrement et rapidement atteinte.

2.4 CHOIX DE LA FONCTION D'ACTIVATION

Le choix de la fonction d'activation d'un réseau de neurones peut affecter considérablement les performances du modèle. Pour choisir cette fonction, plusieurs facteurs doivent être pris en compte: (i) les caractéristiques intrinsèque de la fonction d'activation, (ii) la nature des données, (iii) la profondeur du réseau, et (iv) le rapport entre la précision et l'efficacité de calcul (pour revue sur le choix de la fonction d'activation, Szandala, 2020). La littérature montre que certaines fonctions sont bien adaptées à certains types de problèmes et d'architecture de réseaux. Néanmoins, le choix reste assez largement empirique, les performances finales du réseau justifient *a posteriori* le choix d'une ou l'autre fonction. La fonction « ReLU » pour « Rectified Linear Unit » est souvent le premier choix de fonction d'activation pour le traitement d'images vu qu'elle très simple à implémenter et plus robuste que d'autres fonctions (i.e. sigmoïde et tangente hyperbolique) vis à vis du problème du « vanishing gradient ». D'autre part, seuls les neurones dont l'entrée est positive sont activés simultanément ce qui permet un gain important en efficacité de calculs. La fonction « ReLU » a néanmoins un inconvénient majeur: pour les valeurs d'entrée négatives, elle présente une dérivée nulle, ce qui bloque la rétropropagation du gradient. Dans les

réseaux profonds, ceci peut engendrer une diminution de la performance à la suite de l'inactivation ou « mort » de plusieurs unités au sein de réseau. Pour éviter ce phénomène, un facteur multiplicatif α , est introduit pour les valeurs inférieures à 0 (Figure IV.10). Ce facteur provoque une pente non nulle de la partie négative de la fonction, empêchant ainsi l'inactivité du neurone pour des entrées négatives. Cette variante de la fonction, connue sous le nom de « Leaky ReLU » (Szandała, 2020), est celle que nous avons choisie pour les couches cachées au sein des réseaux de neurones MSR-Net et Res3D-Net. Une simple fonction « ReLU » a été conservée pour la couche de sortie vue la nature strictement positive de la sortie (le débit sanguin).

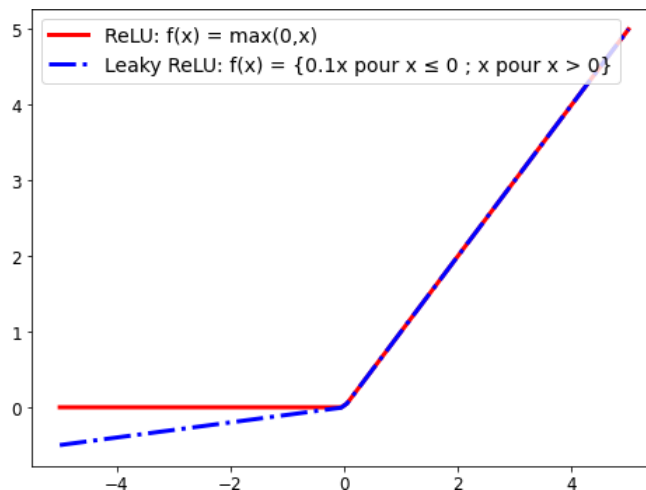


Figure IV.10. Comparaison entre les fonctions d'activation « ReLU » et « Leaky ReLU » ($\alpha = 0.1$).

3 IMPLÉMENTATION ET ENTRAÎNEMENT SUPERVISÉ DES RÉSEAUX DE NEURONES DÉVELOPPÉS AU COURS DE LA THÈSE

Pour l'entraînement des réseaux de neurones, nous avons choisi de produire une base de données expérimentale d'images de contraste speckle multi-exposition dans des conditions contrôlées, proches de la physiologie de la microcirculation plutôt que de développer une base de données simulée. L'hypothèse soutenant ce choix est que cela permettrait d'inclure dans l'apprentissage l'effet des paramètres expérimentaux difficilement simulables, tels que ceux mis en évidence expérimentalement dans le Chapitre III.

3.1 PARAMÈTRES IMPORTANTS POUR L'ENTRAÎNEMENT

Lors de l'entraînement, les données disponibles sont généralement divisées en lots pour optimiser le calcul. La taille d'un lot (ou « batch size ») correspond au nombre d'exemples d'entraînement utilisés dans une seule itération de la descente de gradient stochastique. Plusieurs itérations sont nécessaires pour que toutes les données d'entraînement soient traitées par le réseau. Un paramètre important pour l'entraînement d'un réseau de neurones est le nombre d'époques. Il correspond au

nombre de fois où le réseau de neurones « voit » l'ensemble des données d'entraînement. En général, le choix du nombre d'époques se fait par une approche essai-erreur en observant la différence entre la courbe d'entraînement du réseau et celle de validation. La courbe d'entraînement montre l'évolution de la fonction coût au fil des époques d'entraînement. L'objectif est de réduire cette fonction, qui mesure l'erreur, sur les données d'entraînement. Quant à la courbe de validation, elle représente les performances du modèle sur un ensemble de données de validation distinct, non vu par le réseau au cours de l'entraînement. Cette courbe permet d'évaluer la capacité du modèle à généraliser l'analyse pour de nouvelles données. L'erreur quadratique moyenne est souvent utilisée comme métrique pour les courbes d'entraînement et de validation. En pratique, lorsque la différence entre ces deux courbes devient faible et presque constante, l'entraînement est arrêté pour éviter le surapprentissage (Figure IV.11). En effet, le surapprentissage, également connu sous le nom de surajustement ou « overfitting », se produit lorsque le réseau de neurones s'adapte trop aux données d'entraînement spécifiques, au point de ne plus pouvoir généraliser correctement pour de nouvelles données. Cela se traduit par une détérioration de performance sur les données non-utilisées pour l'apprentissage, malgré une excellente performance sur les données d'entraînement. Le choix du nombre d'époques est également un compromis entre la performance du modèle et le temps d'entraînement.

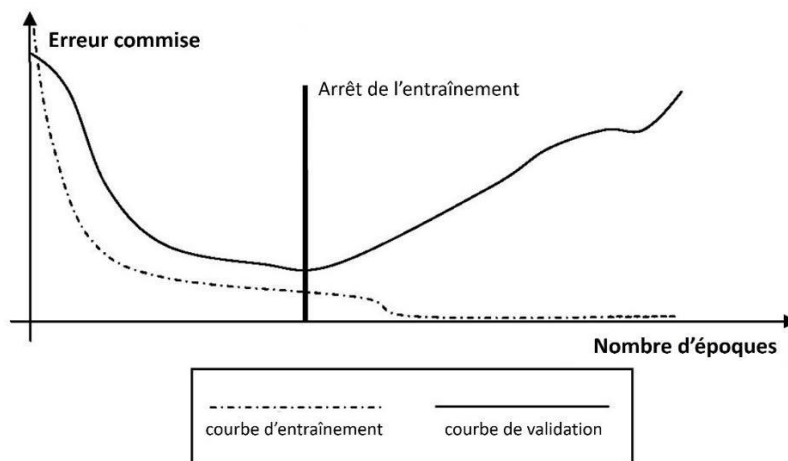


Figure IV.11. Les courbes d'entraînement et de validation. L'apprentissage est arrêté au moment où la différence entre les courbes d'entraînement et de validation est minimale. À ce stade-là, le nombre d'époques optimal est déterminé.

Un autre paramètre important est le taux d'apprentissage λ (cf. Équations IV.3 et IV.6). Ce paramètre détermine la rapidité avec laquelle le modèle apprend et met à jour les poids des connexions entre les neurones. Plus λ est élevé, plus l'entraînement est rapide, mais cela peut également conduire à une instabilité et à une mauvaise convergence. Inversement, si le taux d'apprentissage est trop faible, l'entraînement peut être très lent et il peut être difficile d'atteindre la performance souhaitée. Le taux d'apprentissage est donc un paramètre clé à régler avec soin pour optimiser l'entraînement des réseaux de neurones. Pour l'entraînement des réseaux de neurones nous avons choisi d'utiliser l'optimiseur ADAM (« Adaptive Moment Estimation »). Cet

l'optimiseur calcule une estimation adaptative des moments du premier ordre (la moyenne) et du second ordre (la variance) des gradients pour chaque poids du réseau de neurones. Cela permet une adaptation du taux d'apprentissage en fonction de la variabilité des gradients et des moments des poids. L'optimiseur ADAM combine les avantages de deux autres optimiseurs: la descente de gradient stochastique (SGD pour « Stochastic Gradient Descent ») et l'optimiseur de moyenne mobile (RMSProp pour « Root Mean Square Propagation ») (i.e. adaptativité du taux d'apprentissage, combinaison de méthodes de mise à jour des poids et réduction des oscillations). Ceci fait la force de cet optimiseur qui se manifeste dans sa convergence rapide, sa robustesse à la variation des gradients, et à la faible mémoire requise. Pour accélérer la convergence du réseau, la technique du « momentum » peut aussi être utilisée. Cette technique consiste à rajouter un terme supplémentaire, proportionnel au gradient, dans la mise à jour des poids. L'idée est d'utiliser l'historique des gradients pour accélérer le processus d'optimisation et aider à traverser les zones de plateau ou les minima locaux. Les paramètres tels que la taille de lot, le taux d'apprentissage, le momentum et le nombre d'époques sont déterminés empiriquement et varient en fonction de la taille de la base de données, de la complexité du réseau et des ressources informatiques disponibles (Alzubaidi et al., 2021; Makwe et al., 2021).

3.2 LA BASE DE DONNÉES D'ENTRAÎNEMENT

Les deux réseaux de neurones ont été entraînés par apprentissage supervisé. Le système d'imagerie speckle MESI à exposition synthétique décrit dans la section III.2.2 a été utilisé pour la génération d'une base de données d'images MESI sur une puce microfluidique. Les images de speckle brutes ont une dimension de 1920 x 1440 pixels. Les données MESI ont été obtenues pour les temps d'exposition suivants: 1, 2, 5, 10, 15, 25 et 50 ms et pour deux niveaux de grandissement de l'optique (x2.5 et x6) correspondant à des champs de vision respectifs de 3 x 2.1 mm² et 1.1 x 0.9 mm². Pour toutes les conditions, les images de contraste speckle K à différents temps d'exposition ont été générées en utilisant la technique d'exposition synthétique MESI comme détaillé dans les sections III.2.3 et III.2.4.3 avec un filtre glissant de 5 x 5 pixels.

Le système microfluidique a été décrit en détail précédemment (section III.3.1). Les images de contraste speckle ont été obtenues pour différents débits dans des canaux microfluidiques de 40, 60, 80, 100, 300 et 500 µm de largeur. Nous avons utilisé une solution d'intralipide diluée à 2 % comme solution diffusante. Pour la construction de la base de données, des débits de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 µl/min ont été utilisés. Ces débits sont représentatifs des vitesses du sang dans les capillaires et les artérioles (vitesses correspondantes comprises entre 0.5 et 30 mm/s). Toutes les valeurs de débit ont été utilisées pour générer la base de données, sauf pour le canal de 40 µm où le débit le plus élevé pouvant être atteint avec une stabilité fiable était de 5 µl/min. En résumé, la base de données est composée de 630 images de contraste speckle (sept temps d'exposition, deux grandissements, huit débits pour cinq canaux et cinq débits pour le plus petit canal) soit 315 images pour chaque grandissement. Des images de contraste speckle représentatives de la base de données sont présentées dans la Figure IV.12.

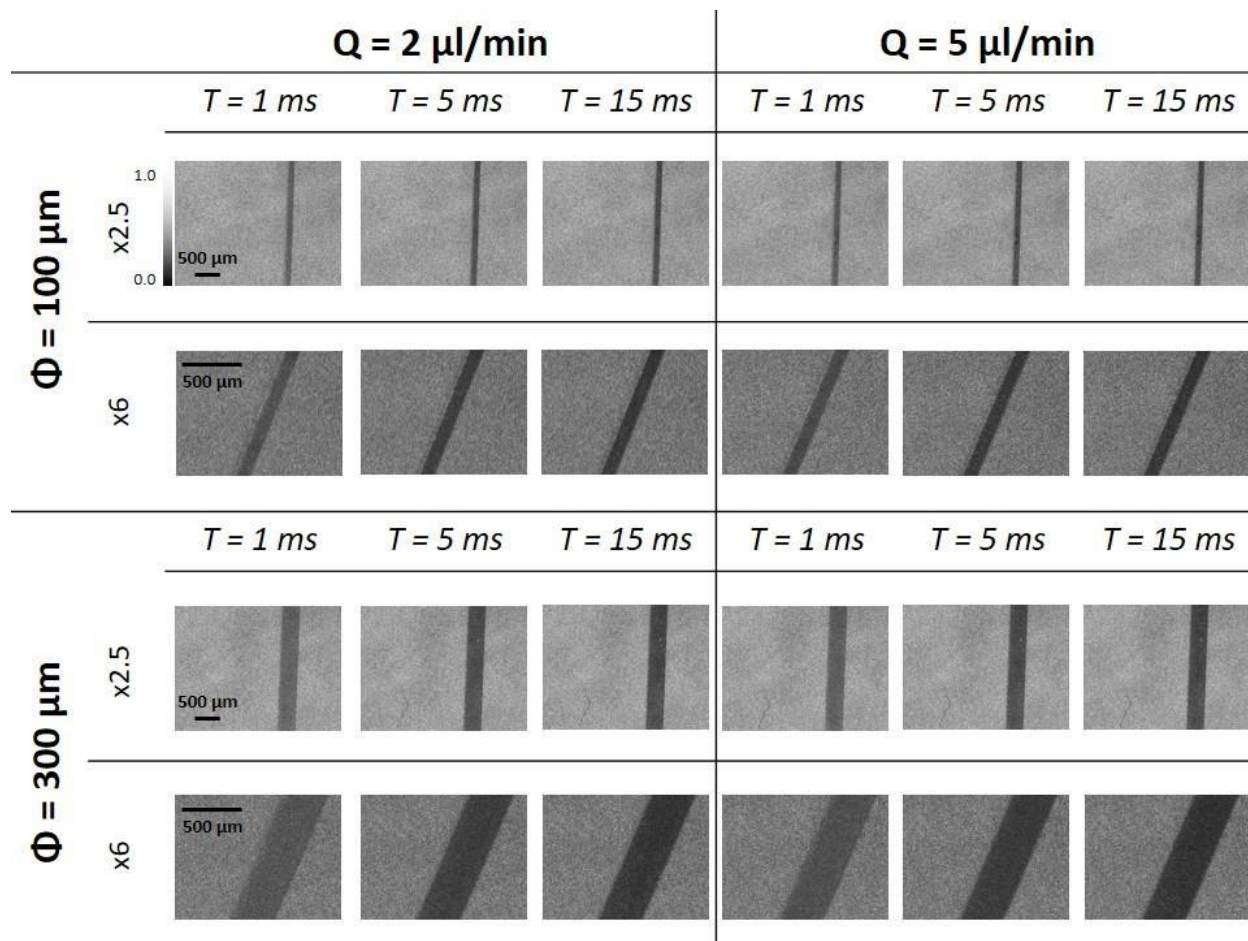


Figure IV.12. Exemples d'images de contraste speckle de la base de données utilisée pour l'entraînement des réseaux de neurones. Des images représentatives du contraste speckle sont montrées pour des débits de $Q = 2 \mu\text{l}/\text{min}$ et $Q = 5 \mu\text{l}/\text{min}$, deux diamètres de canaux différents $\Phi = 100 \mu\text{m}$ et $\Phi = 300 \mu\text{m}$ et deux niveaux de grandissement (x2.5 et x6). Dans chaque cas, des images de contraste sont affichées pour trois temps d'exposition ($T = 1 \text{ ms}$, $T = 5 \text{ ms}$ et $T = 15 \text{ ms}$).

La Figure IV.13 montre l'évolution du contraste speckle en fonction des différents temps d'exposition, pour deux canaux microfluidiques, deux débits différents et deux grandissements de l'optique. Comme prévu, le contraste speckle diminue avec l'augmentation du temps d'exposition et du débit. L'utilisation d'un grandissement optique plus important conduit à des valeurs de contraste significativement plus élevées pour les mêmes paramètres de débit, d'exposition et de diamètre de canal. Le calcul du nombre de pixels de la caméra par grain de speckle (autrement dit, l'échantillonnage spatial au niveau du capteur) conduit à des valeurs comprises entre 2.5 et 4.5, bien au-delà du critère d'échantillonnage de Shannon-Nyquist. Néanmoins, le calcul du rapport de la taille du filtre utilisé (5 pixels) sur le ratio $\frac{d_{\text{speckle}}}{d_{\text{pixel}}}$ (rapport devant être supérieur à 2.5 selon Thompson et al., 2011) donne des valeurs de 2.4 et 1.1 pour des grandissements de x2.5 et x6 respectivement. La valeur à x2.5 est proche du seuil conseillé. En revanche, la faible valeur à un grandissement x6 entraîne une sous-estimation du contraste speckle en raison d'un manque de statistique dans le calcul de σ . La normalisation par une estimation expérimentale de β rapproche

sensiblement les valeurs de contraste aux temps d'exposition courts mais ne permet pas de retrouver les mêmes courbes $K = f(T)$ pour les deux valeurs de grossissements en particulier pour les temps d'exposition longs (Figure IV.14). Ceci implique que d'autres paramètres que le grossissement, comme la profondeur de champ, pourraient affecter le contraste (Sigal et al., 2013; Zheng et al., 2021). Ce résultat souligne la pertinence de l'utilisation d'images expérimentales pour entraîner le réseau de neurones sur une base de données incorporant des effets instrumentaux difficiles à simuler.

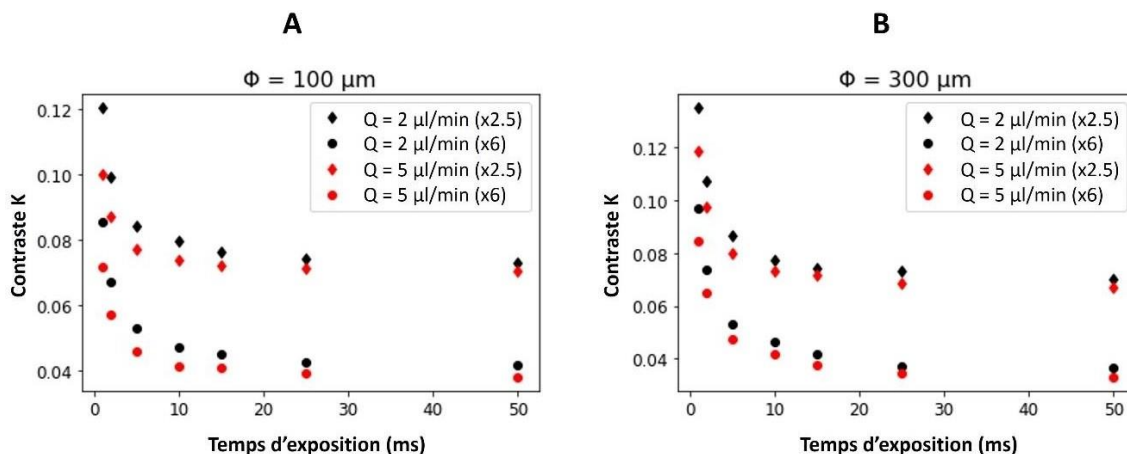


Figure IV.13. Variation du contraste speckle en fonction du temps d'exposition. (A) Pour un canal de diamètre $\Phi = 100 \mu\text{m}$. (B) Pour un canal de diamètre $\Phi = 300 \mu\text{m}$. Les symboles noirs correspondent au débit de $2 \mu\text{l/min}$. Les symboles rouges correspondent au débit de $5 \mu\text{l/min}$. Les losanges correspondent au grossissement x2.5. Les points correspondent au grossissement x6.

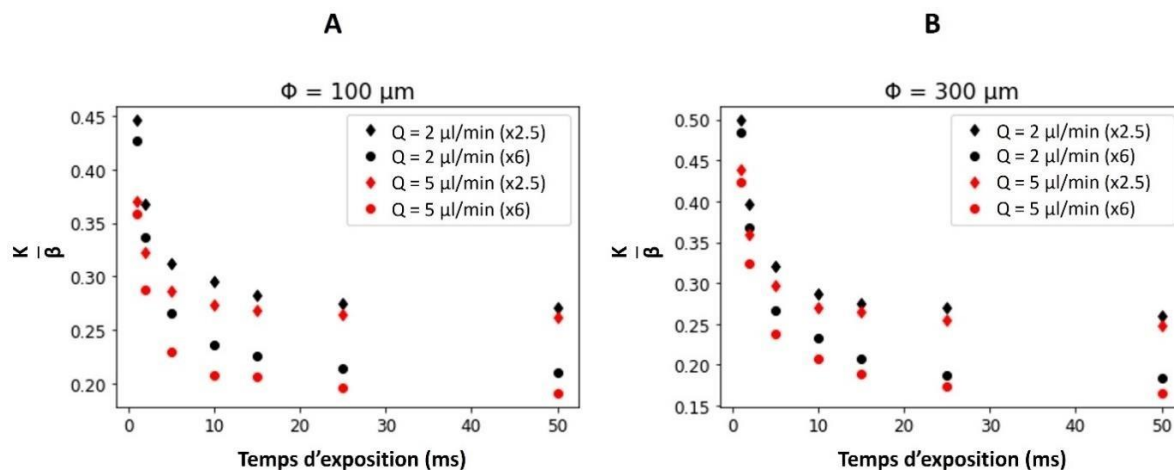


Figure IV.14. Contraste speckle en fonction du temps d'exposition après normalisation par une estimation expérimentale de β calculée sur un grand champ de vision. Cette normalisation n'a pas permis de retrouver complètement les mêmes courbes $K = f(T)$ pour les différents grossissements. Cela suggère l'exploration d'autres paramètres pertinents (i.e. la profondeur de champ) qui pourraient être des sources potentielles de cette divergence dans les courbes de contraste. (A) Pour un canal de diamètre $\Phi = 100 \mu\text{m}$. (B) Pour un canal de diamètre $\Phi = 300 \mu\text{m}$. Les symboles noirs correspondent au débit de $2 \mu\text{l/min}$. Les symboles rouges correspondent au débit de $5 \mu\text{l/min}$. Les losanges correspondent au grossissement x2.5. Les points correspondent au grossissement x6.

La base de données produite au cours de la thèse constitue à notre connaissance un ensemble unique de données expérimentales de contraste speckle multi-exposition acquis dans des conditions bien contrôlées de débit, d'exposition et de dimension représentatives de la physiologie du débit sanguin. Elle a été déposée sur le serveur de données ouvertes « Recherche Data Gouv » (Chammas et al., 2023).

Le Tableau IV.2 résume les caractéristiques des réseaux de neurones MSR-Net et Res3D-Net implémentés dans cette thèse, ainsi que les paramètres techniques relatifs à la construction de la base de données d'entraînement.

	MSR-Net	Res3D-Net
Modalité d'imagerie speckle	MESI	
Temps d'exposition	1, 2, 5, 10, 15, 25, 50 ms	
Type de données d'entraînement	Expérimentales (canaux microfluidiques de diamètres allant de 40 à 500 μm et des débits allant de 1 à 8 $\mu\text{l}/\text{min}$)	
Type de réseau de neurones	CNN	
Nombre de couches cachées	21	17
Sortie du réseau	Carte de vitesse sanguine (mm/s)	
Fonction d'activation dans les couches cachées	$F(x) = \begin{cases} 0.1x & \text{pour } x \leq 0 \\ x & \text{pour } x > 0 \end{cases}$	
Fonction d'activation dans la couche de sortie	$F(\cdot) = \max(0, x)$	
Validation <i>in vivo</i>	Oui	

Tableau IV.2. Tableau récapitulatif des données d'entraînement et des deux architectures de réseaux de neurones implémentées pour l'analyse des données speckle MESI.

3.3 GÉNÉRATION DES CARTES CIBLES DE DÉBIT

La génération des cartes cibles de débit consiste à créer des paires d'images « entrée-cible » pour l'entraînement des réseaux de neurones (Figure IV.15). À chaque groupe d'images de contraste à sept temps d'exposition, doit être associé une carte cible de débit définie en se basant sur le débit dans le canal, le diamètre du canal et la taille du pixel à un certain niveau de grandissement. Dans une première approche, nous avons généré des cartes de débit cibles binaires avec l'extérieur du canal à un débit nul et l'intérieur à un débit correspondant au débit moyen mesuré lors de

l'acquisition des données speckle. Cette approche a été abandonnée car elle montrait des biais importants dans l'apprentissage. En effet, le débit réel n'est pas homogène en chaque point du canal et présente une distribution radiale. Nous avons donc calculé une carte cible plus réaliste associée à chaque image de contraste speckle. En se basant sur la géométrie connue des canaux microfluidiques et la valeur du débit moyen mesuré, les cartes de débit de cible ont été générées pour chaque dimension de canal et chaque débit expérimental, à l'aide d'un modèle de dynamique des fluides visqueux (Loi de Poiseuille) de la boîte à outils FEATool Multiphysics. Le dispositif expérimental utilisé garantit que les conditions d'application sont vérifiées (flux laminaire, régime permanent). Par ailleurs, les images de contraste speckle expérimentale, dont les valeurs se situent entre 0 et 1, ont été segmentées à l'aide de l'algorithme FCM pour « Fuzzy C-Means », qui sépare l'arrière-plan du canal. Finalement, le modèle prédéfini de la carte de débit et l'image segmentée ont été recalés pour générer la carte cible de débit. Ce processus est appliqué pour toutes les images de la base de données d'entraînement.

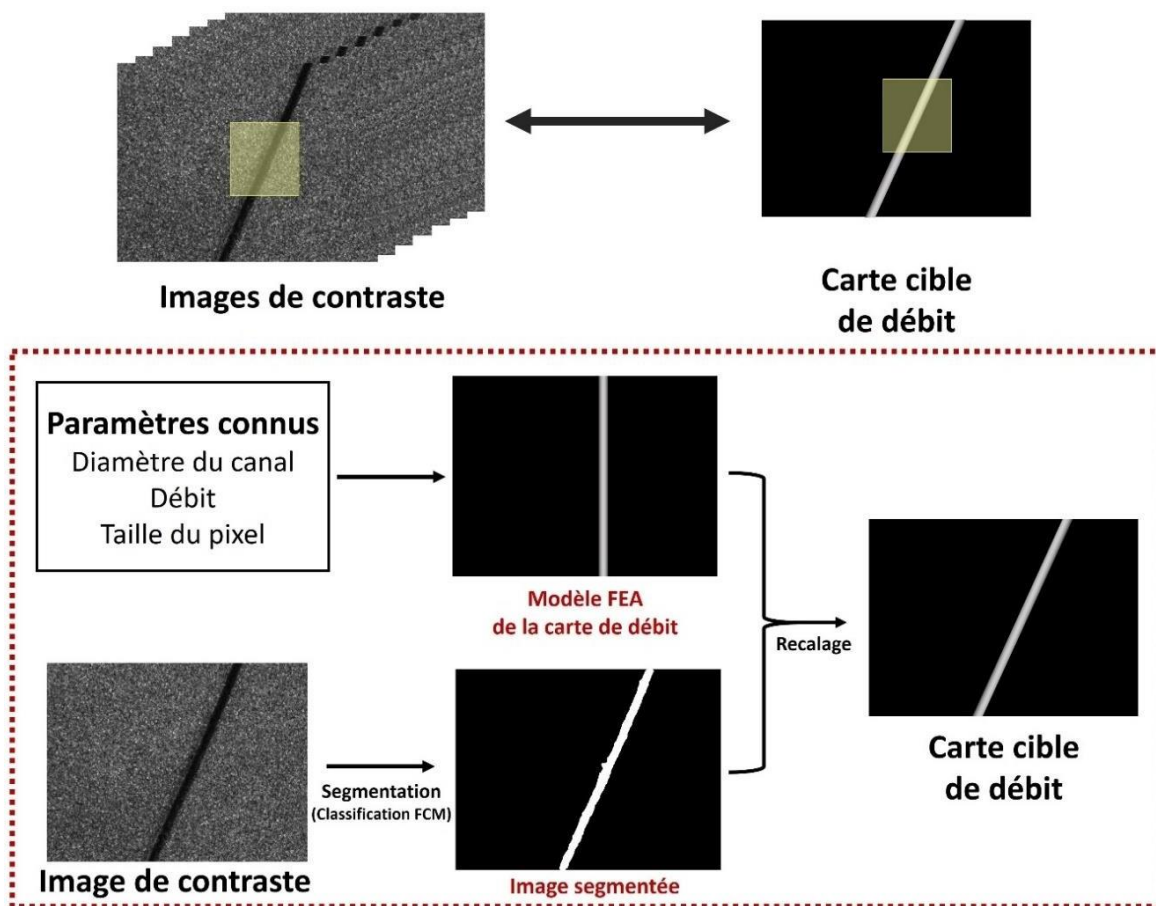


Figure IV.15. Génération des paires d'images « entrée-cible » pour l'entraînement du réseau de neurones. L'encadré en pointillés rouges présente les détails de la transformation des images de contraste en cartes cibles de débit. Le modèle FEA (Analyse par Éléments Finis) est implémenté sous FEATool en accord avec les modèles physiques de dynamique des fluides visqueux en régime laminaire permanent.

3.4 GÉNÉRATION DES PATCHS POUR L'APPRENTISSAGE ET LA VALIDATION

La phase d'apprentissage des réseaux CNN nécessite une base de données constituée de nombreuses images acquises dans des conditions parfaitement contrôlées. Cette exigence n'est pas facile à satisfaire en pratique, en particulier lorsque les données d'entraînement sont des données expérimentales. Afin d'augmenter la quantité d'images disponible à partir de notre base de données d'images de contraste speckle, nous avons utilisé une approche consistant à échantillonner des patchs de manière aléatoire dans les images de contraste de speckle. Cela permet de générer de nombreuses paires de patchs « entrée-cible » à partir d'un nombre limité d'images de contraste speckle et des cartes cibles. Un avantage complémentaire de cette stratégie est qu'elle permet de détecter les caractéristiques locales des régions. Pendant la phase d'apprentissage, des patchs de 128 x 128 pixels contenant un nombre non nul de pixels associés au canal microfluidique sont sélectionnés au hasard dans les images de contraste. Les patchs correspondants sont simultanément extraits de la carte de débit cible aux mêmes coordonnées. Si toutes les valeurs des pixels dans le patch choisi dans l'image cible sont nulles, le patch est considéré comme extérieur au canal et est exclu. Dans le cas contraire, le patch est retenu pour l'entraînement. Toutes les positions respectives des différents patchs retenus sont conservées afin de pouvoir reconstruire l'image finale en respectant la position initiale des patchs. La taille de patchs choisie est de 128 x 128 pixels; cette valeur empirique est souvent utilisée en analyse par réseaux convolutionnels en imagerie médicale (Soares et al., 2020). Un jeu de données, présenté au réseau pour l'entraînement, consiste en sept patchs de 128 x 128 pixels pris aux mêmes coordonnées pour les sept temps d'exposition pour une combinaison de « canal-débit ». Pour un grandissement donné, 50 jeux de données sont générés pour chaque combinaison d'images « canal-débit ». Une « augmentation » supplémentaire des données d'entrée est obtenue avec la rotation aléatoire de l'image pour simuler différentes orientations des vaisseaux sanguins dans les images speckle (Figure IV.16). Ainsi, pour chaque combinaison de « canal-débit » nous avons 50 jeux de données de plus par grandissement. Ceci résulte en un total de 4500 jeux de données par grandissement (100 jeux de données pour 45 combinaisons de « canal-débit »). Une fois que le réseau a été entraîné sur un ensemble de données d'entraînement, il est important de vérifier comment il se comporte sur les données de validation, ce qui sera présenté dans la section suivante (section IV.3.5).

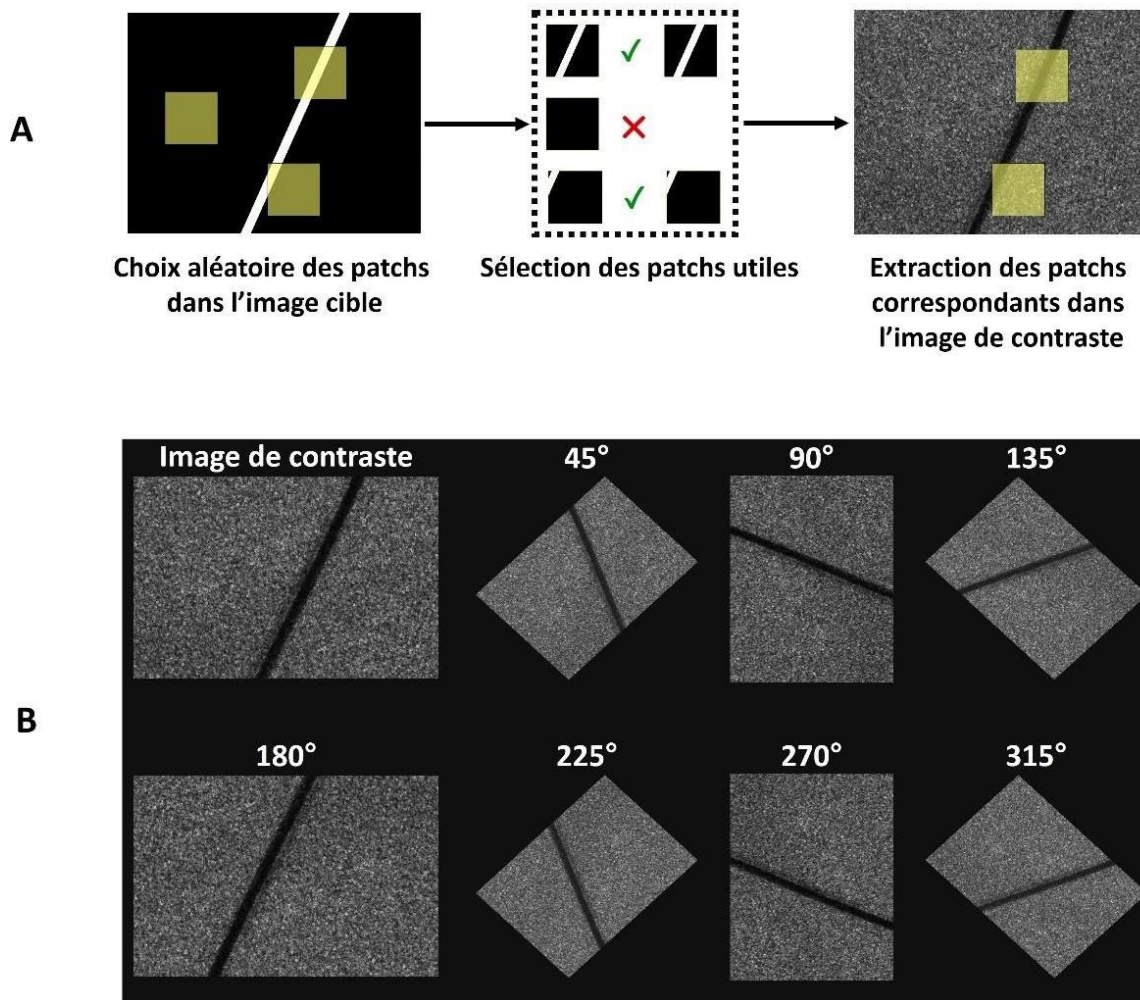


Figure IV.16. Représentation de l'étape de génération des patches. (A) Extraction des patches utiles à partir des images de contraste. (B) Représentation de l'augmentation de données utilisée.

3.5 IMPLÉMENTATION ET VALIDATION CROISÉE DES RÉSEAUX DE NEURONES MSR-NET ET RES3D-NET

Les deux architectures de réseau ont été implémentées et entraînées à l'aide de MATLAB R2021a (station de travail GPU NVIDIA Quadro GV100, 32 Go de RAM). Les boîtes à outils utilisées sont les suivantes: « Deep Learning », « Global Optimization », « Image Processing », « Parallel Computing », « Partial Differential Equation », « Symbolic Math » et « Curve Fitting ». Les poids pour la convolution ont été initialisés avec l'initialiseur Xavier. L'erreur quadratique moyenne (fonction coût) et l'optimiseur ADAM ont été utilisés pour optimiser les poids avec un taux d'apprentissage de 0.01 et un momentum de 0.9. Une taille de lot de 100 patches est adoptée pour l'apprentissage des réseaux. Tous les réseaux ont été entraînés pendant 50 époques, paramètre déterminé de manière empirique à partir des courbes d'entraînement et de validation lors de l'apprentissage. Le modèle formé est converti au format ONNX (« Open Neural Network

Exchange ») pour pouvoir être déployé sur différentes plateformes, en particulier sous Python. Les deux réseaux MSR-Net et Res3D-Net ont été entraînés et leurs performances ont été évaluées selon les protocoles détaillés ci-dessous. Les réseaux optimisés en termes de poids ont par la suite été appliqués pour validation au traitement des données provenant des fantômes microfluidiques, puis au traitement des données MESI *in vivo*, ainsi qu'à la comparaison des résultats du réseau de neurones Res3D-Net avec la méthode d'ajustement non-linéaire appliquée aux mêmes données. Pour un nombre de blocs résiduels $B = 5$, l'entraînement des réseaux MSR-Net et Res3D-Net dure respectivement 5 et 3 heures en moyenne.

Les performances d'un réseau de neurones sont évaluées sur un ensemble de données indépendantes non vues par le réseau, appelé données de validation. Pour quantifier les performances, différentes métriques (cf. section IV.4.1) peuvent être utilisées. Les performances des réseaux de neurones (MSR-Net et Res3D-Net) ont été évaluées dans un premier temps par la méthode de validation croisée à cinq niveaux (ou « 5-fold cross-validation »). Cette méthode schématisée sur la Figure IV.17 permet une estimation robuste des performances des modèles (Refaeilzadeh et al., 2009).



Figure IV.17. Schéma représentatif de la validation croisée à cinq niveaux.

L'ensemble de jeux de données d'entraînement (entrée et cible) est composé de 18000 patches obtenus par échantillonnage aléatoire de 200 patches de chacun des 90 ensembles de données MESI correspondant à différents paramètres expérimentaux (cinq débits pour le canal de 40 μm de diamètre, huit débits pour les cinq autres dimensions de canal, chacun à deux grandissements optique). L'ensemble des données a été utilisé pour l'entraînement (80 %) et la validation (20 %) partie par partie. Les patches ont été répartis de manière aléatoire en cinq groupes, chacun comportant le même nombre de patches indépendants (3600 patches par groupe). Les patches d'une seule combinaison de paramètres microfluidiques « canal-débit-grandissement » ne peut appartenir qu'à un des groupes exclusivement. Chaque groupe contient donc des données

provenant d'une combinaison unique de paramètres microfluidiques (différents débits, diamètres de canal et niveaux de grandissement). Cette validation croisée a été mise en œuvre pour optimiser la capacité de généralisation du réseau pour la prédiction des débits en fonction de différents paramètres microfluidiques. Elle permet de tester chaque réseau cinq fois sur cinq groupes de données différents, ce qui permet d'évaluer la moyenne et la variance de l'erreur en sortie.

Dans un second temps, pour comparer les performances du réseau de neurones Res3D-Net avec la méthode d'ajustement non-linéaire, nous avons utilisé l'approche de validation standard (non croisée). Chaque image de speckle de la base de données MESI a été divisée horizontalement en deux: la moitié supérieure a été utilisée pour l'entraînement et la moitié inférieure pour la validation. Pour chacun des 90 jeux de données, la moitié supérieure des images est échantillonnée aléatoirement en 100 paires de patches « entrée-cible » associées (total de 200 patches), ce qui donne un ensemble de données d'entraînement composé de 18000 patches (200 patches pour chacun des 90 jeux de données). De même, les données de validation consistent en 18000 patches correspondant à la moitié inférieure des images de contraste. Dans ce cas, contrairement à la méthode de validation croisée, les patches de l'ensemble de données d'apprentissage couvrent tous les paramètres microfluidiques.

	Validation croisée	Validation standard
Nombre de combinaisons « canal-débit »	45	45
Nombre de grandissements optiques utilisés	2	2
Nombre de patches « entrée-cible »	200	200
Nombre total de patches	$45 \times 2 \times 200 = 18000$	$(45 \times 2 \times 200) \times 2 = 36000$
Répartition des patches	Les 18000 patches sont répartis en 5 groupes de 3600 patches pour chaque étape de la validation.	La moitié des patches (18000) sert à entraîner le réseau; l'autre moitié (18000) est utilisée pour la validation.

Tableau IV.3. Récapitulatif du nombre de patches utilisés pour les différentes approches de validation.

3.6 PRÉDICTION DES CARTES DE DÉBIT À PARTIR DES RÉSEAUX ENTRAÎNÉS

La prédiction des cartes de débit se fait à partir des réseaux de neurones pré-entraînés et validés. Les étapes pour la prédiction sont:

- (i) Chargement du réseau de neurones entraîné.
- (ii) Chargement des images expérimentales de contraste K pour les différents temps d'exposition.
- (iii) Génération aléatoire des positions des patches.
- (iv) Extraction des patches à partir des images de contraste pour chaque temps d'exposition en utilisant les positions générées à l'étape précédente.
- (v) Prédiction des patches de débit à partir du réseau de neurones entraîné.
- (vi) Concaténation et superposition des patches prédits à la taille de l'image complète.
- (vii) Sauvegarde de la carte de débit prédite.

Au cours de la phase de prédiction, l'image de contraste speckle est divisée en patches uniformes se chevauchant à moitié. L'utilisation de patches avec recouvrement permet d'éviter efficacement l'artefact de non-continuité des blocs associés. Ces patches sont ensuite introduits dans le réseau de neurones dans un ordre séquentiel. Une carte de débit complète est finalement assemblée à partir des patches prédits.

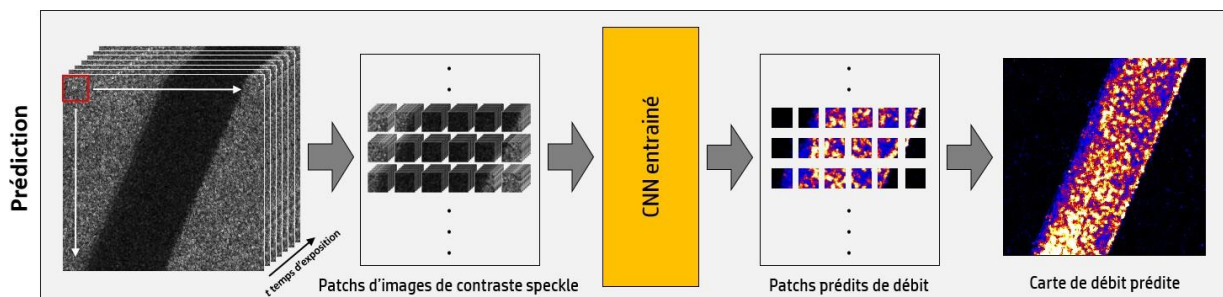


Figure IV.18. Prédiction des cartes de débit. Des patches de 128 x 128 pixels avec recouvrement des patches adjacents sont extraits à partir des images de contraste speckle acquises sur les données microfluidiques. Chaque patch des images de contraste est traité individuellement par le réseau entraîné. Les patches prédits sont ensuite réassemblés pour former la carte de débit en sortie.

La Figure IV.19 résume les différentes étapes depuis l'entraînement supervisé du réseau jusqu'à la prédiction des cartes de débit. À partir des données de contraste MESI à deux niveaux de grossissements ($G1$ et $G2$), les cartes cibles de débit sont générées. Ensuite, les images cibles et les images de contraste speckle sont utilisées pour créer les patches d'apprentissage. Ces patches sont présentés au réseau de neurones pour l'entraîner. Une fois que l'entraînement est achevé, le réseau entraîné devient capable de prédire des cartes de débit sur de nouvelles données de contraste speckle acquises à différents temps d'exposition.

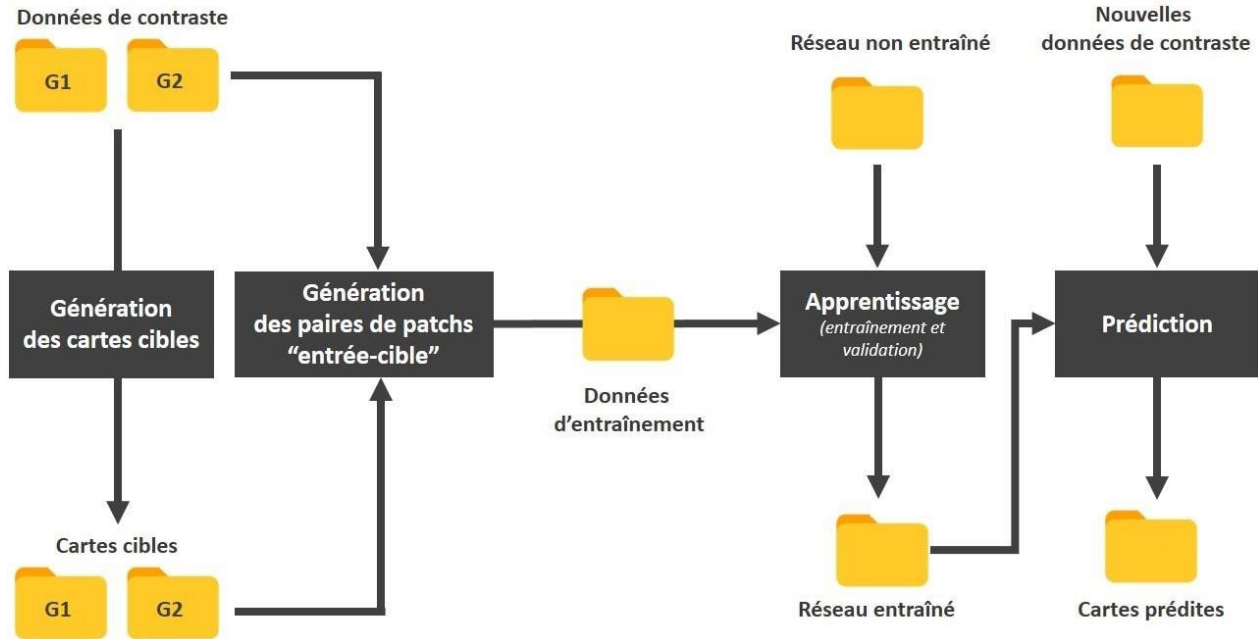


Figure IV.19. Schéma récapitulatif des différentes étapes nécessaires pour entraîner le réseau de neurones puis prédire les cartes de débit.

4 PERFORMANCES DES RÉSEAUX DE NEURONES DÉVELOPPÉS

4.1 COMPARAISON DES PERFORMANCES DES RÉSEAUX DE NEURONES: MSR-NET *VERSUS* RES3D-NET

Pour évaluer les performances des deux réseaux de neurones MSR-Net et Res3D-Net, nous avons mesuré l'erreur absolue moyenne (EAM), l'erreur quadratique moyenne (EQM), le rapport signal sur bruit maximal (RSBM) et l'indice de similarité structurelle (ISS) entre la carte de débit prédite et la carte cible de débit. Ces critères de performance sont définis comme suit:

$$EAM = \frac{1}{M} \sum_{i \in M} |f_i - \hat{f}_i| \quad (\text{Équation IV.8})$$

$$EQM = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i \in M} (f_i - \hat{f}_i)^2} \quad (\text{Équation IV.9})$$

$$RSBM = 20 \cdot \log_{10} \frac{MAX}{RMSE} \quad (\text{Équation IV.10})$$

$$ISS = \frac{(2\mu_f + C_1)(2\sigma_f + C_2)}{(\mu_f^2 + \mu_{\hat{f}}^2 + C_1)(\sigma_f^2 + \sigma_{\hat{f}}^2 + C_2)} \quad (\text{Équation IV.11})$$

où M est le nombre total de pixels dans l'image, f_i et \hat{f}_i désignent le débit au pixel i pour les cartes de débit prédites et les cartes cibles, respectivement, MAX indique la valeur d'intensité maximale de l'image évaluée, C_1 et C_2 sont des constantes, tandis que μ_f , $\mu_{\hat{f}}$, σ_f , $\sigma_{\hat{f}}$ et σ_{ff} sont les paramètres

statistiques d'images (moyennes et écarts-types respectivement). Nous cherchons à obtenir les valeurs les plus faibles possibles pour EAM, EQM et les plus élevées possibles pour RSBM et ISS.

Le Tableau IV.4 résume les mesures d'évaluation des performances EAM, EQM, RSBM et ISS pour les cartes de débit prédites à l'aide des réseaux MSR-Net et Res3D-Net par rapport aux cartes cibles. Pour les deux réseaux, le nombre de blocs résiduels B a été augmenté de un à six et, nous observons empiriquement que la précision du réseau augmente avec l'augmentation de B. L'ajout de blocs résiduels augmente également la difficulté à atteindre la convergence, ce qui se traduit par un temps d'apprentissage beaucoup plus long. Compte tenu de la nécessité d'un compromis entre précision et durée d'apprentissage, le nombre optimal de blocs résiduels a été fixé à cinq pour les deux réseaux. Au-delà, nous observons une dégradation des performances et une augmentation du temps d'apprentissage. Pour évaluer les différences statistiques entre les prédictions de Res3D-Net et de MSR-Net pour le nombre optimal de blocs résiduels, nous avons effectué un test de rang signé de Wilcoxon sur les métriques des résultats de validation croisée à cinq niveaux. Aucune différence significative n'a été trouvée pour la performance prédictive entre les deux réseaux. Cependant, le réseau Res3D-Net a montré des niveaux d'incertitude plus faibles dans l'estimation ponctuelle des paramètres de performances par rapport au MSR-Net, ce qui suggère des prédictions plus robustes. Par conséquent, l'approche Res3D-Net a été sélectionnée pour la suite des expériences.

Type du réseau	Nombre de blocs résiduels (B)	EAM±ES	EQM±ES	ISS±ES	RSBM±ES
MSR-Net	1	1.86 ± 0.16	0.57 ± 0.09	0.67 ± 0.05	92.18 ± 0.58
	2	1.61 ± 0.09	0.44 ± 0.05	0.75 ± 0.03	93.09 ± 0.57
	3	1.53 ± 0.05	0.41 ± 0.03	0.75 ± 0.02	93.24 ± 0.23
	4	1.46 ± 0.09	0.39 ± 0.04	0.78 ± 0.04	93.94 ± 0.48
	5	1.33 ± 0.11	0.38 ± 0.07	0.73 ± 0.08	94.80 ± 0.62
	6	1.36 ± 0.08	0.40 ± 0.06	0.68 ± 0.15	94.36 ± 0.50
Res3D-Net	1	1.59 ± 0.08	0.47 ± 0.06	0.53 ± 0.08	93.23 ± 0.32
	2	1.49 ± 0.07	0.39 ± 0.04	0.75 ± 0.06	93.76 ± 0.34
	3	1.46 ± 0.07	0.39 ± 0.04	0.71 ± 0.04	93.81 ± 0.35
	4	1.44 ± 0.06	0.39 ± 0.03	0.72 ± 0.07	93.84 ± 0.32
	5	1.37 ± 0.06	0.36 ± 0.03	0.73 ± 0.06	94.40 ± 0.32
	6	1.38 ± 0.06	0.37 ± 0.04	0.68 ± 0.07	94.29 ± 0.39

Tableau IV.4. Comparaison des mesures de performance pour les différents réseaux implémentés. Les meilleures performances pour chaque mesure sont indiquées en rose. Les valeurs correspondent à la moyenne des métriques sur les cinq ensembles de résultats prédits à partir de la validation croisée à cinq niveaux et à l'erreur standard correspondante.

4.2 COMPARAISON DE L'APPROCHE PAR RÉSEAU DE NEURONES À LA METHODE D'AJUSTEMENT NON-LINÉAIRE

Un des principaux objectifs de la thèse est de développer un réseau de neurones capable d'extraire les cartes de débit sanguin dans un laps de temps compatible avec les contraintes propres aux applications médicales. Il s'agit de disposer d'une carte du débit relatif en quelques secondes pour permettre l'analyse lors de l'examen du patient. Le but est de proposer une alternative à l'ajustement non-linéaire qui prend plusieurs minutes à plusieurs dizaines de minutes selon la taille de l'image et les ressources informatiques disponibles. Pour valider l'usage du Res3D-Net, il est nécessaire de le comparer au modèle d'ajustement non-linéaire (Équation III.21) incorporant la contribution des diffuseurs fixes et des bruits (Parthasarathy et al., 2008) qui est jusqu'à présent l'approche de référence pour l'analyse des données MESI.

Les Figure IV.20.A et IV.20.B montrent une comparaison entre les cartes de débits générées par le Res3D-Net et les cartes ICT dérivées de l'ajustement non-linéaire pour différents débits et sous deux grossissements ($\times 2.5$ et $\times 6$ respectivement) pour le canal de diamètre $\Phi = 300 \mu\text{m}$. Comme indiqué au chapitre précédent, la relation exacte entre le débit et l'ICT n'est pas connue, bien qu'il existe une relation de proportionnalité entre les deux (Briers, 1996; Duncan et al., 2008a). Par conséquent, nous comparons les cartes relatives normalisées par rapport à la valeur maximale de débit respectivement $\text{ICT} = 1/\tau_c$. Nous observons que pour certains pixels l'ajustement non-linéaire ne converge pas ou produit des valeurs extrêmes non réalistes. Ceci peut être induit par un échantillonnage temporel sous-optimal (T minimal de 1 ms) dû à l'approche d'acquisition synthétique simplifiée (Chammas et al., 2022). Pour atténuer ces effets, un filtre médian 2D (15 x 15 pixels) a été appliqué à la carte ICT avant de comparer les profils des deux cartes. Les Figures IV.20.C et IV.20.D montrent les profils correspondants dans la région centrale (sur 40 pixels) des deux cartes ICT et débit pour un débit de $8 \mu\text{l}/\text{min}$. Les profils prédits par les deux approches présentent des distributions spatiales très corrélées, en particulier des variations fines du débit au pixel près sont visibles. Pour la prédiction par Res3D-Net, nous observons également une dynamique plus importante (facteur de cinq entre la dynamique des cartes obtenues par réseaux et par régression non-linéaire) entre les débits faibles et élevés, et des prédictions spatialement plus homogènes des variations relatives du débit sans pixels présentant des valeurs aberrantes ou une absence de convergence. Ce dernier point confirme l'intérêt de l'approche CNN qui intègre les informations des pixels voisins lors de l'extraction des caractéristiques régionales par le biais du calcul de convolution spatiale. Il est intéressant de noter que l'approche CNN semble également réduire les artefacts de bord (valeurs plus élevées des vitesses prédites sur les bords du canal) dus au traitement spatial du contraste speckle et de la position de la source lumineuse.

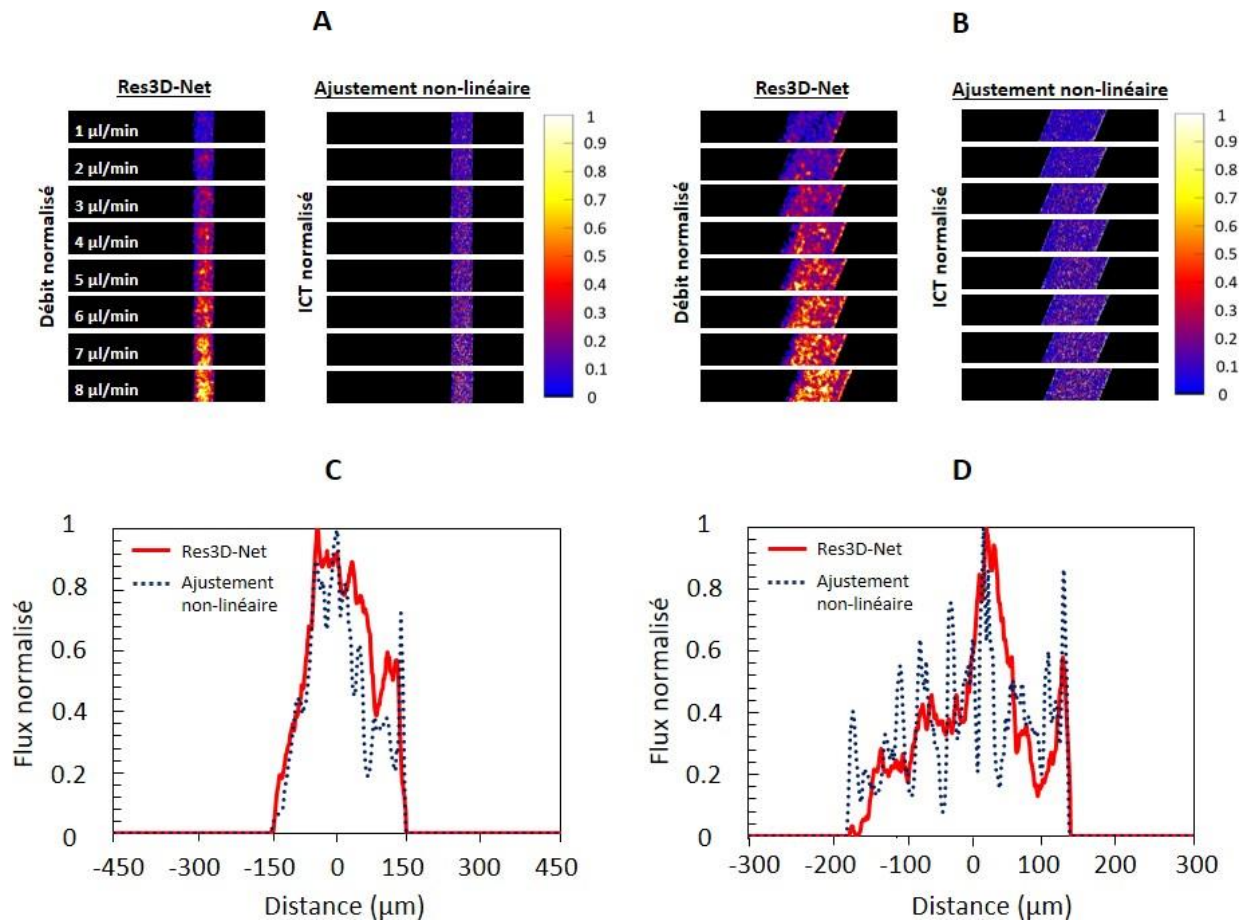


Figure IV.20. Comparaison des cartes de débit prédites par le Res3D-Net et des cartes ICT dérivées de l'ajustement non-linéaire sous (A) un grandissement de x2.5 et (B) un grandissement de x6. Pour chaque carte de débit/ICT, les valeurs ont été normalisées à la valeur maximale de débit/ICT. (C et D) Les profils correspondants à (A) et (B) respectivement extraits des deux cartes à un débit de 8 µl/min.

La Figure IV.21 montre les changements relatifs de débits prédits par le Res3D-Net et des ICT en fonction du débit dans des canaux de diamètre croissant (60, 80, 100 et 300 µm). Tous les changements relatifs sont normalisés par rapport à un débit de référence de 4.5 µl/min (moyenne des différents débits), ce qui correspond à une pente théorique attendue de 0.22. Dans tous les canaux, les changements relatifs estimés soit par l'approche CNN soit par l'ajustement non-linéaire montrent une variation linéaire avec les changements relatifs du débit mesurés dans le canal. Cependant, l'approche CNN est beaucoup plus performante en termes de linéarité. Les valeurs de R^2 pour le Res3D-Net s'étalent entre 0.82 et 0.96, tandis que celles de l'ajustement non-linéaire vont de 0.21 à 0.91. La pente de la régression linéaire dérivée des résultats prédits par Res3D-Net, à l'exception du plus petit canal, varie entre 0.19 et 0.23, ce qui est proche de la pente de 0.22 théorique attendue. En revanche, l'ajustement non-linéaire est très sensible aux bruits, ce qui se traduit par une plage de pente d'environ 0.09 à 0.23. En outre, l'approche de l'ajustement non-linéaire entraîne des valeurs aberrantes telles que la variation relative du débit pour un débit de 4 µl/min dans le canal de 80 µm ou la variation relative du débit à 8 µl/min dans le canal de 100 µm.

Dans le cas du plus petit canal, la pente de la ligne de régression des résultats prédits par CNN s'écarte des valeurs attendues du débit. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette divergence et seront discutés dans la section VI.2. Dans l'ensemble, le Res3D-Net présente une pente plus élevée que l'ajustement non-linéaire, ce qui indique une plage dynamique plus large et plus robuste en réponse à des augmentations du débit.

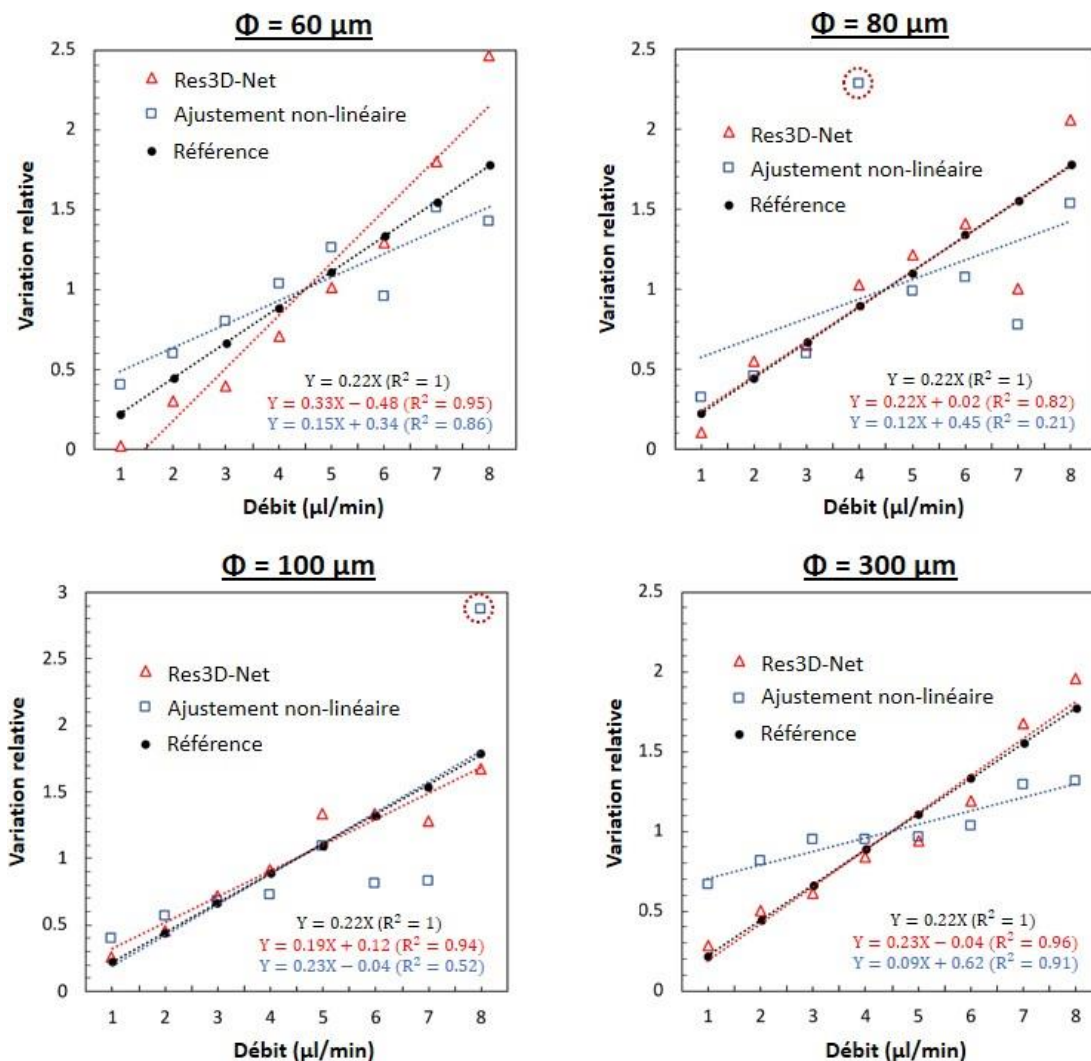


Figure IV.21. Variations relatives des débits et des ICT (normalisation des valeurs à un débit de 4.5 µl/min) en fonction du débit réel dans des canaux microfluidiques de différents diamètres (60, 80, 100 et 300 µm). Les cercles en pointillé montrent des points aberrants obtenus par rapport à la régression linéaire.

Au-delà des performances dans la prévision des débits, nous avons comparé les temps de calcul nécessaires pour prédire une carte de flux avec le réseau de neurones Res3D-Net et pour réaliser l'ajustement non-linéaire. La Figure IV.22 montre les mesures de temps de calcul par les deux méthodes d'inférence pour une image de 700 x 700 pixels, ce qui correspond à une ROI standard pour une application biomédicale avec une caméra sCMOS standard de 1 à 3M pixels. La Figure IV.22.A montre le gain temporel très élevé, de l'ordre de 9000, que le Res3D-Net apporte comparé

à l'ajustement non-linéaire sur les mêmes données, ceci pour un calcul sur un ordinateur avec un seul cœur logique. Le temps d'inférence diminue en utilisant le calcul en parallèle sur plusieurs cœurs. Il diminue relativement plus vite pour la régression non-linéaire. Néanmoins, il est clair qu'avec l'ajustement non-linéaire, le temps de calcul de 1246 s soit presque 20 minutes est loin d'être adapté pour une mesure en temps-réel, même pour un système à 32 cœurs. La Figure IV.22.B montre l'évolution du temps de calcul en fonction du nombre de cœurs logiques utilisés pour le Res3D-Net. À partir de trois cœurs, le temps de calcul descend en dessous de la seconde et se situe entre 0.4 et 0.5 secondes pour six à 32 cœurs logiques utilisés. Ceci montre le potentiel de développement des CNN comme alternative à l'ajustement non-linéaire pour les applications cliniques. Par ailleurs, il est possible de se limiter à quatre à six cœurs correspondant à un PC standard sans avoir besoin d'utiliser un ordinateur d'architecture complexe et coûteuse.

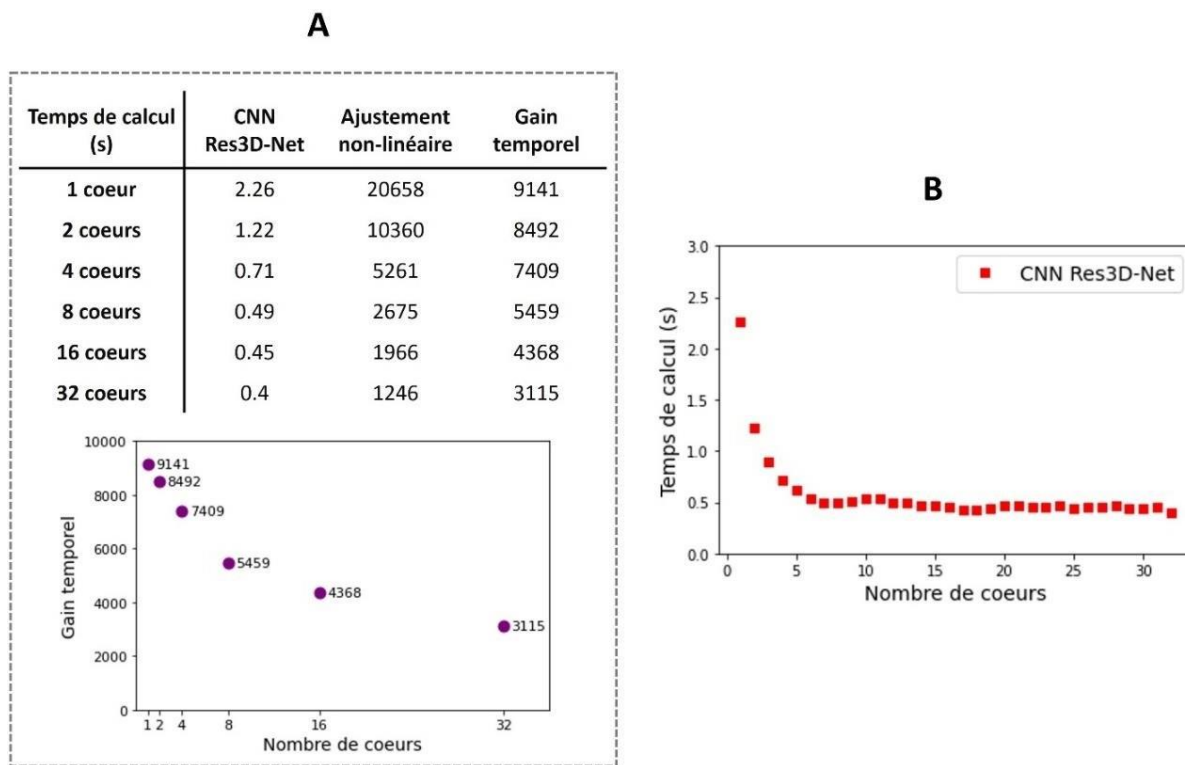


Figure IV.22. Le temps de calcul est estimé sur une image de 700 x 700 pixels en utilisant Python v3.9. (A) Gain temporel en fonction du nombre de cœurs logiques utilisés. Le gain temporel est défini comme le rapport entre le temps de calcul de l'ajustement non-linéaire et le temps de calcul du Res3D-Net. (A) Temps de calcul de l'approche CNN Res3D-Net en fonction du nombre de cœurs logiques utilisés.

CONCLUSION

Nous avons développé deux réseaux de neurones CNN, le MSR-Net et le Res3D-Net, pour étudier la possibilité de remplacer l'ajustement non-linéaire pour l'estimation du débit sanguin par une approche par réseaux de neurones. Dans ce but, nous avons produit, avec la technique MESI à exposition synthétique, une base de données sur des canaux microfluidiques avec des diamètres de canaux et des valeurs de débits représentatifs de la microvascularisation chez la souris et ceci pour deux niveaux de grandissement optique. En premier lieu, nous avons comparé les performances des réseaux MSR-Net et Res3D-Net. Les 2 réseaux ont montré des performances presque équivalentes. Néanmoins, le Res3D-Net est plus rapide à entraîner et présente des niveaux d'incertitude plus faibles dans l'estimation des différents critères de performance. Par conséquent, l'approche Res3D-Net a été sélectionnée pour la suite des expériences. En second lieu, nous avons comparé l'approche par réseau de neurones Res3D-Net à la méthode d'ajustement non-linéaire en nous basant sur les cartes de débit prédites par le CNN et les cartes d'ICT calculées par le modèle d'ajustement. Lors de cette comparaison, l'approche par CNN s'est montrée supérieure à l'ajustement non-linéaire sur plusieurs plans: (i) la résistance aux bruits expérimentaux, (ii) la dynamique plus large du débit, (iii) la prédiction plus homogène dans l'espace, (iv) la linéarité par rapport aux valeurs de débit réel, et (v) le temps de calcul compatible avec les applications en temps-réel. L'ensemble de ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Biomedical Optics Express*, jointe à la fin de ce manuscrit. Une inconnue majeure à ce stade du travail est la capacité du réseau entraîné sur des données microfluidiques *in vitro* à analyser des images MESI obtenues *in vivo* sur des objets de géométries et flux beaucoup plus complexes. Le chapitre suivant sera consacré à la validation *in vivo* sur un modèle murin de l'utilisation du MESI à exposition synthétique associée à l'analyse des cartes de débit sanguin par CNN.

CHAPITRE V. ÉTUDE DE LA VARIATION DU DÉBIT SANGUIN CÉRÉBRAL CHEZ LES SOURIS OBÈSES PAR MESI EN EXPOSITION SYNTHÉTIQUE

1	Physiopathologie de l'obésité	130
2	Systèmes vasculaires impliqués dans le couplage neurovasculaire	134
3	Systèmes cellulaires impliqués dans le couplage neurovasculaire	136
4	Description anatomofonctionnelle du cortex somatosensoriel en tonneaux	139
5	Protocole d'obtention du modèle animal de l'obésité	142
6	Validation de l'exposition synthétique <i>in vivo</i>	144
6.1	Préparation des animaux pour la chirurgie	144
6.2	Protocole d'acquisition	145
6.3	Protocole d'analyse des données	146
6.4	Comparaison de l'exposition synthétique à l'exposition modulée <i>in vivo</i>	146
7	Variation de la réponse hémodynamique induite par stimulation des vibrisses dans le cortex somatosensoriel en tonneaux des souris obèses comparées aux souris témoins	149
7.1	Protocole de stimulation du cortex somatosensoriel en tonneaux	149
7.2	Protocole d'analyse des données	150
7.3	Comparaison de la réponse hémodynamique entre les groupes de souris suite à la stimulation du cortex somatosensoriel en tonneaux	152
7.4	Effet de la supplémentation en DHA sur la réponse hémodynamique	154
	Conclusion	157

1 PHYSIOPATHOLOGIE DE L'OBÉSITÉ

L'obésité est une maladie chronique multifactorielle qui constitue un facteur de risque majeur pour des différentes pathologies telles que le DT2, les maladies cérébrovasculaires, les maladies cardiovasculaires et le cancer. Elle est considérée comme l'épidémie du siècle par l'organisation mondiale de la santé (www.who.int). Plus particulièrement, l'obésité infantile est un problème de santé publique de plus en plus préoccupant, en particulier dans les pays à revenu faible ou intermédiaire, où la prévention précoce, qui est cruciale, est absente. Les causes de l'obésité sont complexes et multifactorielles mais convergent vers un déséquilibre métabolique défini par une augmentation de la consommation d'aliments hypercaloriques riches en sucres, en lipides et en sel, en association avec une diminution de la dépense énergétique principalement due à la sédentarité. L'évolution du mode vie urbain, plus anxiogène, et le contexte socio-environnemental, participent aux problèmes psychologiques qui entraînent une dérégulation de la prise alimentaire, dans sa qualité et sa quantité dans les différentes tranches d'âges.

La pandémie de COVID-19 a mis en évidence les vulnérabilités des personnes souffrant d'obésité, ce qui rend encore plus urgente la mise en œuvre de politiques de prévention et de prise en charge de l'obésité. En effet, des études ont montré que l'obésité est un facteur de risque important pour les infections et les complications graves liées au COVID-19. Les pays où plus de 50 % de la population est en surpoids ont des taux de mortalité liés à COVID-19 jusqu'à quatre fois plus élevés que ceux où moins de 50 % de la population est en surpoids. Les études estiment que si la prévalence de l'obésité avait été moindre, plusieurs millions de décès liés au COVID-19 auraient été évités (données basées sur la dernière étude sur l'obésité de la fédération mondiale de l'obésité; www.worldobesity.com).

Dans son dernier atlas de l'obésité mondiale publié en 2022, la fédération mondiale de l'obésité montre que le taux d'obésité continuera de croître dans le monde entier dans les années à venir. En 2030, elle prévoit qu'une personne sur cinq sera obèse (Indice de masse corporelle IMC ≥ 30 kg/m²), soit plus d'un milliard de personnes dans le monde. Effectivement, la montée de l'obésité est préoccupante surtout dans les pays à revenu faible et intermédiaire où les systèmes de santé sont mal préparés pour gérer et traiter l'obésité. Il est aussi à noter que cette tendance existe dans le monde entier chez les hommes comme chez les femmes.

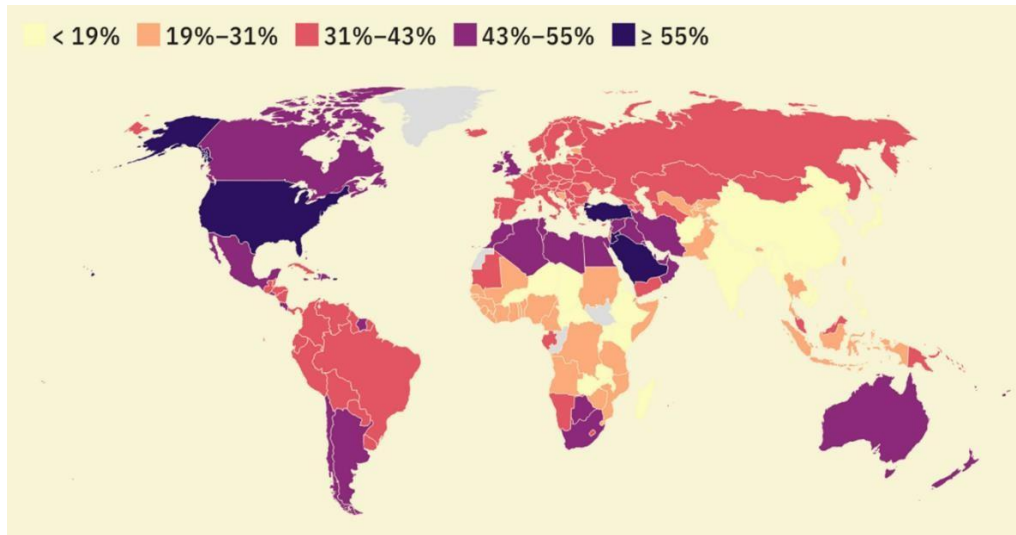


Figure V.1. Pourcentage de la population adulte qui serait obèse d'ici 2035. (www.worldobesity.com)

L'IMC est la mesure la plus couramment utilisée pour catégoriser l'obésité. Il est défini comme le rapport du poids (en kilogrammes) au carré de la taille (en mètres²) de la personne. Le surpoids est défini pour un IMC supérieur à 25. Quand l'IMC dépasse 30, la personne est définie comme étant obèse. Il existe plusieurs classes d'obésité: modérée, sévère, voire morbide quand l'IMC dépasse 40 (Figure V.2). L'IMC, utilisé comme indicateur général pour la masse grasse et la classification de l'obésité, est positivement associé aux facteurs de risque de maladies vasculaires et métaboliques. Cependant, cet indicateur souffre d'imperfections vu qu'il néglige la composition corporelle (i.e. la masse musculaire squelettique) et la répartition des graisses dans les différentes zones du corps qui dépend de plusieurs facteurs comme les hormones sexuelles, donc le genre, et de facteurs génétiques et épigénétiques. De plus, l'utilisation de l'IMC est encore plus problématique chez les personnes obèses âgées ayant une masse musculaire réduite. En fin de compte, si la quantité de graisse est un facteur de risque pour la santé, l'IMC seul reste une approximation pour estimer la santé métabolique d'un individu (Goossens, 2017b).

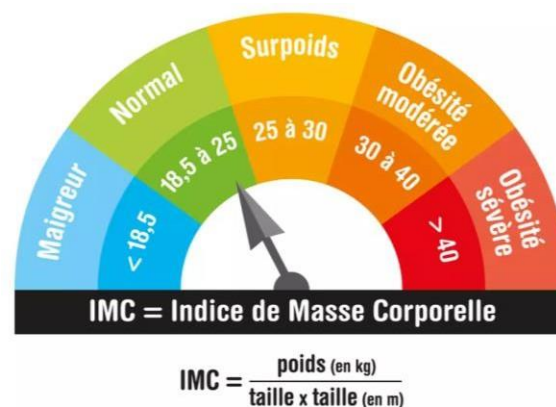


Figure V.2. Schéma de l'IMC normal et de ses variations. (www.sante.journaldesfemmes.fr)

L'obésité est, dans une première approche biomédicale, une maladie du tissu adipeux. Les adipocytes sont des cellules du tissu adipeux qui stockent les réserves d'énergie sous forme de graisses. Plus ces cellules accumulent des lipides, plus elles s'hypertrophient. Une fois que ces cellules atteignent leur volume maximal, elles recrutent de nouvelles adipocytes prêtes à se charger en graisse et finissent par proliférer. Ainsi, la masse adipeuse croît par l'augmentation du volume et du nombre des adipocytes. Néanmoins, le rôle des cellules adipocytaires ne se limite pas au stockage de graisses. Elles agissent également comme des cellules endocriniennes (synthèse et libération de leptine, une hormone anorexigène), avec des rôles métaboliques multiples dans la régulation de la physiologie du corps. Chez les personnes normales et maigres, les adipocytes favorisent l'homéostasie métabolique. En revanche, chez les personnes obèses, ces cellules hypertrophiées recrutent les macrophages et favorisent l'inflammation et la libération de facteurs qui prédisposent à une résistance à l'insuline (Greenberg et al., 2006b).

Le développement de l'obésité déclenche une inflammation dans l'organisme qui peut toucher différents organes vitaux tels que le foie en causant une stéatose ou en rendant le foie gras; cette hépatotoxicité, si elle n'est pas traitée, peut progresser vers une cirrhose hépatique. Les reins sont également vulnérables aux effets néfastes de l'obésité et du diabète. En effet, selon une étude publiée dans le BEH (Bulletin épidémiologique hebdomadaire) (BEH, 2016), les personnes en surpoids (IMC ≥ 25) présentent deux fois plus de risques de développer une insuffisance rénale terminale que l'ensemble de la population. Ce risque se multiplie par trois chez les personnes obèses (IMC ≥ 30) et par sept chez celles dont l'IMC dépasse 40 (obésité morbide). En outre, les effets toxiques de l'obésité atteignent aussi le pancréas entraînant un épuisement de la synthèse d'insuline et un risque accru du DT2. Effectivement, l'obésité induit la résistance à l'insuline ainsi qu'à la leptine et l'intolérance au glucose et entraîne et exacerbe les anomalies métaboliques présentes dans le DT2, telles que l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie et la dyslipidémie (pour revue sur l'obésité et le DT2, Maggio et al., 2003). De plus, l'obésité complique le traitement pharmacologique du diabète: la perte de sensibilité à l'insuline induit une toxicité liée à l'excès du glucose dans le sang qui vient s'ajouter à la toxicité des lipides circulants rendant les organes vitaux encore plus vulnérables.

Le cerveau joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Il est constamment informé par des signaux hormonaux, métaboliques et nerveux de l'état énergétique de l'organisme. Il intègre ces signaux et assure la mise en œuvre d'une réponse appropriée pour la régulation de l'état énergétique du corps, notamment en contrôlant la prise alimentaire au niveau des noyaux de l'hypothalamus. L'hypothalamus est le centre de la satiété et de la faim et la structure effectrice du contrôle de la balance énergétique (Lopaschuk et al., 2010). Le développement neuronal de résistances multiples à des signaux hormonaux aussi importants que l'insuline pancréatique et la leptine du tissu adipeux, entraîne l'organisme dans un cercle vicieux de toxicités métabolique et inflammatoire ingérables. Le comportement alimentaire se trouve dérégulé. En parallèle, des dysfonctionnements majeurs de l'activité vasculaire, qu'ils soient d'origine cardiaque ou cérébrale, mènent les patients au décès. Plus particulièrement, le couplage neurovasculaire (Figure

V.3) est à la base de la régulation du débit sanguin au niveau des vaisseaux sanguins cérébraux à la suite d'une signalisation neuronale. Ce couplage est nécessaire pour adapter dynamiquement le débit sanguin aux besoins métaboliques et énergétiques du cerveau, un ensemble de mécanismes aussi dénommés hyperémie fonctionnelle (Phillips et al., 2016). Le débit sanguin cérébral est régulé au niveau des réseaux de neurones en activité basale, mais, surtout, doit l'être finement en état d'activation pendant un codage sensoriel ou un traitement cognitif de l'information: les entrées de nutriments comme le glucose ou de gaz essentiels à la respiration cellulaire comme l'oxygène, les sorties de déchets cellulaires comme les protons ou le dioxyde de carbone, et la température cérébrale, doivent être étroitement contrôlées très localement. Des études ont montré qu'un régime riche en gras engendre une altération du couplage neurovasculaire physiologique, mettant en péril les entrées et sorties vasculaires dans les réseaux de neurones (W. Li et al., 2013). En comparant deux groupes de rats mâles, un groupe sous régime riche en gras avec un groupe de rats témoins, cette étude montre, par des mesures avec une sonde de laser Doppler, que la variation du CBF suite à la stimulation des vibrisses était significativement réduite chez les rats obèses par rapport aux contrôles (W. Li et al., 2013). Ces rats sous régime riche en gras montrent une augmentation du poids corporel et de l'adiposité sans changement significatif de la pression artérielle, de la glycémie ou du taux d'insuline. D'autre part, le DT2 et l'obésité constituent un facteur de risque majeur pour les pathologies cérébrovasculaires telles que les AVC mais aussi les maladies neurodégénératives comme la démence vasculaire et la maladie d'Alzheimer. À titre d'exemple, l'augmentation du débit sanguin rétinien suite à la photostimulation chez l'homme est réduite chez les patients en hyperglycémie aiguë (Dorner et al., 2003). De même, la réponse à la stimulation lumineuse des artères rétiniennes est significativement réduite chez les sujets diabétiques indiquant une altération de l'hyperémie fonctionnelle (Dorner et al., 2003). Ces données montrent qu'à l'instar de la microvascularisation des organes comme le rein, les yeux ou les extrémités corporelles, les vaisseaux sanguins de très petits calibres sont altérés dans le cerveau, comme dans le rein ou l'extrémité des membres, en cas d'obésité et de diabète. De plus, une étude clinique montre l'altération du couplage neurovasculaire chez les patients diabétiques en se basant sur des données d'IRMf (Duarte et al., 2015). Des rats diabétiques présentent une diminution de dynamique du débit sanguin suite à la stimulation somatosensorielle des vibrisses en comparaison à un groupe témoin (Kelly-Cobbs et al., 2012). Finalement, l'impact délétère de l'obésité sur la santé ne se limite pas aux pathologies souvent associées comme le diabète et l'hypertension. En effet, plusieurs études montrent que le régime riche en gras lui-même, et de façon très rapide, induit la neuro-inflammation et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans différentes régions du cerveau, rendant ainsi le cerveau plus vulnérable aux substances toxiques qui peuvent être présentes dans le sang (Davidson et al., 2012, 2013).

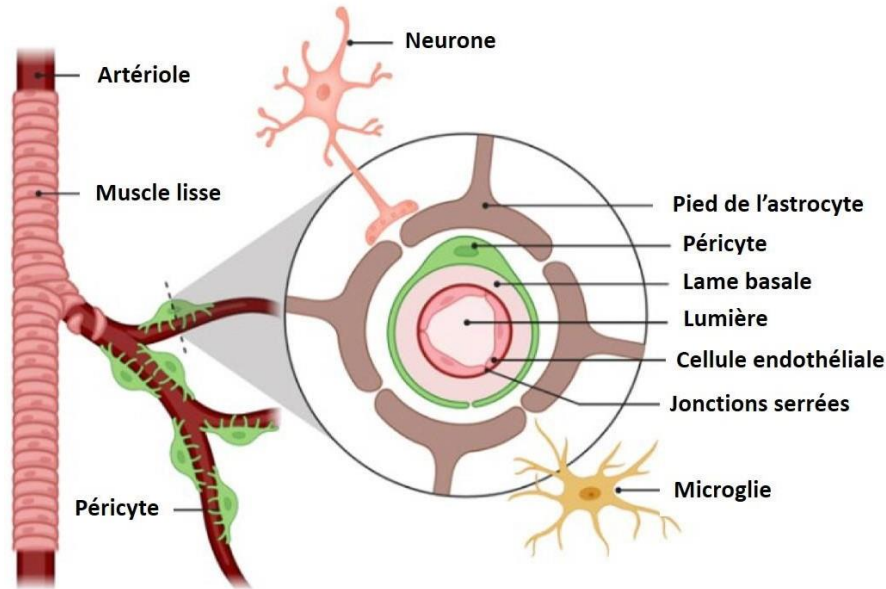


Figure V.3. Composition schématique de l'unité neurovasculaire au niveau de la barrière hémato-encéphalique. (Adaptée de Barzegar-Fallah et al., 2022)

Les neurones et les vaisseaux sanguins présentent des relations anatomiques et fonctionnelles étroites et forment l'unité neurovasculaire au niveau des artérioles et des capillaires. Nous présentons dans les sections suivantes l'anatomie et la physiologie des systèmes vasculaires et neuronaux qui sont à la base du couplage neurovasculaire.

2 SYSTÈMES VASCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LE COUPLAGE NEUROVASCULAIRE

À la base du cerveau des mammifères se situe un réseau complexe d'artères connu sous le nom de Cercle de Willis (Figure V.4). Ce réseau d'artères joue un rôle crucial dans l'apport du sang au cerveau. L'irrigation artérielle du cerveau est assurée par deux groupes principaux d'artères: les artères carotides internes et l'artère basilaire. Les artères carotides internes, se ramifient en artères cérébrales antérieures et en artères cérébrales moyennes de chaque côté du cerveau. Les artères cérébrales antérieures irriguent la partie avant du cerveau, notamment les lobes frontaux. Quant aux artères cérébrales moyennes, elles fournissent du sang à la surface latérale du cerveau, y compris les lobes pariétaux et temporaux. En outre, l'artère basilaire, provenant de la fusion des artères vertébrales gauche et droite, fournit à son tour du sang au tronc cérébral, au cervelet et à la moelle épinière cervicale. Finalement, les artères cérébrales postérieures émergent de l'artère basilaire et irriguent la partie arrière du cerveau notamment les lobes occipitaux (Coucha et al., 2018). Ensemble, ces artères forment un cycle continu de flux sanguin qui assure un apport constant en oxygène et en nutriments au cerveau. En effet, le cercle de Willis assure une boucle de circulation sanguine collatérale en cas d'obstruction d'une des artères cérébrales (lors d'un AVC

par exemple). Dans ce cas, ces différentes connexions artérielles permettent de maintenir un débit sanguin adéquat vers le cerveau, réduisant ainsi l'impact de l'AVC sur la fonction cérébrale (Oumer et al., 2021; pour revue sur l'unité neurovasculaire, Schaeffer et al., 2021). Ainsi, si l'artère cérébrale moyenne est touchée par une ischémie, les troubles seront d'ordre sensorimoteurs et non pas cognitifs comme observé lors d'une ischémie de l'artère cérébrale antérieure.

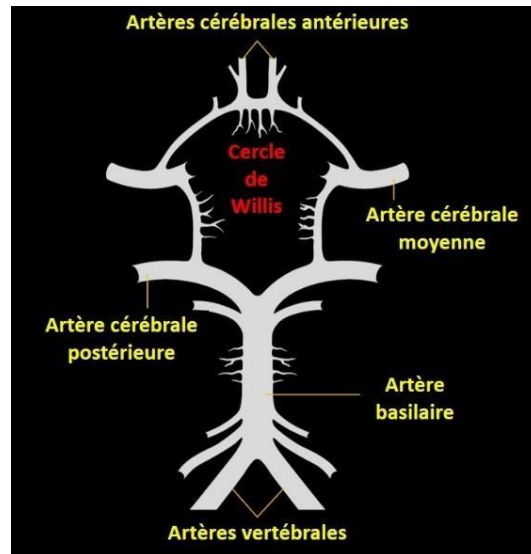


Figure V.4. Représentation schématique du cercle de Willis et de ses principales branches. (Adaptée de Schaeffer et al., 2021)

Les constituants cellulaires de l'unité neurovasculaire varient en fonction du type, de la taille et de la localisation des vaisseaux sanguins, de la partie superficielle du cerveau vers les couches plus profondes (Figure V.5). À la surface du cerveau, les grandes artères piales se ramifient en artères plus petites et en artérioles. Les artères piales sont composées d'une couche de cellules endothéliales, d'une couche de cellules musculaires lisses et d'une couche de cellules leptomeningées. Les artères piales sont innervées par des nerfs périvasculaires, provenant du système nerveux autonome, qui contrôlent la dilatation et la contraction des artères et des artérioles à travers la sécrétion de neurotransmetteurs spécifiques. Cela participe au tonus vasculaire cérébral. Une autorégulation par l'élasticité des muscles lisses permet de contrôler la pression vasculaire entrant dans les couches profondes dans une gamme précise: les vaisseaux sanguins plus profonds ont un diamètre plus réduit, peu ou pas de muscles lisses et sont donc plus fragiles, incapables de supporter de fortes pressions artérielles. Les artères piales progressent dans le parenchyme cortical et se ramifient en artérioles pénétrantes au sein de l'espace de Virchow-Robin. Au niveau des artérioles se trouvent une couche de cellules endothéliales et une couche de cellules musculaires lisses. Les artérioles sont en contact avec les pieds astrocytaires et les prolongements neuronaux. En pénétrant plus profondément, les artérioles se divisent en un réseau dense de capillaires. La paroi des capillaires est très fine et composée de cellules endothéliales fixées sur la membrane basale dans laquelle sont disposés des péricytes, une population cellulaire spécifique au contact des vaisseaux de la microcirculation, ayant également des propriétés contractiles. La

paroi des capillaires est constituée d'une seule couche de cellules endothéliales facilitant ainsi l'échange des nutriments et des gaz entre le sang et le parenchyme. À noter, c'est la seule location dans l'arbre cérébrovasculaire où ces échanges peuvent effectivement avoir lieu. La densité des capillaires est très élevée dans le tissu cérébral, et les neurones ne sont jamais plus loin que quelques dizaines de microns du capillaire le plus proche, même s'ils ne rentrent généralement pas en contact physique avec eux. Les artérioles et les capillaires sont impliqués dans la régulation locale de l'activité microvasculaire. Tout au long de ce chemin vasculaire, le débit sanguin chute, ce qui favorise les échanges moléculaires et gazeux au niveau des capillaires (voir le Tableau II.1 du Chapitre II). Finalement, les capillaires se rejoignent pour former les veinules ayant une lumière plus petite et une paroi beaucoup plus épaisse que celle des artérioles. Ces différences anatomiques avec les artérioles impliquent une extensibilité plus importante des veines assurant des changements plus importants de volume et de pression du sang circulant. Les veinules se rejoignent pour former un large système veineux. Au final, les veines cérébrales superficielles et inférieures se déchargent progressivement dans les sinus et assurent le drainage du sang (Drake et al., 2007).

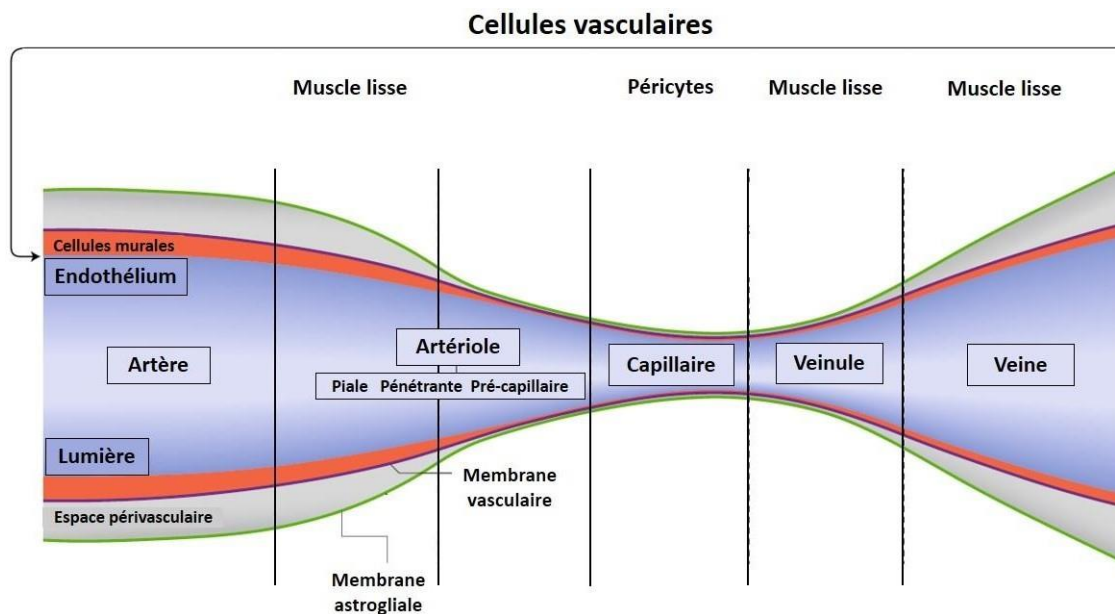


Figure V.5. Hétérogénéité segmentaire des artères cérébrales et diversité des cellules vasculaires. (Adaptée de Schaeffer et al., 2021)

3 SYSTÈMES CELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS LE COUPLAGE NEUROVASCULAIRE

L'hyperémie fonctionnelle, phénomène macroscopique d'augmentation du CBF en réponse à une stimulation neuronale, dépend au niveau cellulaire des mécanismes du couplage neurovasculaire. Ce couplage est un processus complexe impliquant plusieurs types de neurones et de cellules gliales et vasculaires (Figure V.6).

Au niveau des artères piales, des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales sont en étroite communication avec les nerfs périvasculaires assurant le couplage neurovasculaire. Les cellules musculaires lisses répondent à l'augmentation de la pression intravasculaire par une constriction. Cette propriété permet à ces cellules musculaires de s'opposer au changement du débit sanguin induit par la pression, et contribue à la capacité des vaisseaux sanguins à maintenir le flux face aux changements de la pression artérielle. En outre, les jonctions lacunaires entre les cellules musculaires lisses facilitent la propagation des signaux vasculaires le long du vaisseau. Lorsque les vaisseaux pénètrent plus profondément dans le cerveau, l'espace Virchow-Robin disparaît et les vaisseaux deviennent des artérioles et des capillaires intraparenchymateux. À ce niveau, les cellules musculaires et les péricytes entrent directement en contact avec les processus neuronaux et les pieds astrocytaires (Drake et al., 2007; Lecrux et al., 2011; Schaeffer et al., 2021).

Les cellules endothéliales formant les artérioles sont étroitement associées aux astrocytes, des cellules gliales peuplant densément le cerveau. L'action des astrocytes, associées aux microglies, peut influencer le diamètre des artérioles, et par suite la quantité de sang qui circule dans les tissus cérébraux (Drake et al., 2007). Par ailleurs, les microglies exécutent aussi leur fonction initiale immunitaire dans le cerveau en participant aux processus de cicatrisation et d'élimination de substances toxiques. Les cellules endothéliales cérébrales sont également elles-mêmes des acteurs clés dans le couplage neurovasculaire. Enroulées dans les prolongements des cellules neurogliales et des cellules musculaires, les cellules endothéliales forment la BHE, qui protège le cerveau des substances indésirables présentes dans le sang. Elles assurent également le transport facilité de certaines hormones essentielles au fonctionnement du cerveau comme l'insuline. Les cellules endothéliales peuvent libérer diverses substances vasoactives. Il s'agit notamment des vasodilatateurs, tels que l'oxyde nitrique (NO) et des vasoconstricteurs tels que l'endothéline, en plus des prostaglandines produites par la cyclooxygénase (COX) qui peuvent avoir un effet vasodilatateur ou vasoconstricteur. Les cibles finales des médiateurs vasoactifs, qu'ils soient libérés par les cellules endothéliales, les astrocytes ou les neurones, sont les cellules musculaires lisses et les péricytes qui agissent pour modifier le diamètre des vaisseaux sanguins cérébraux donc le débit sanguin. Des études suggèrent que les péricytes répondent aux signaux vasoactifs en se contractant ou en se relaxant pour modifier le diamètre vasculaire (Kawamura et al., 2003).

Les cellules pyramidales glutamatergiques sont les cellules les plus nombreuses dans le cortex cérébral. Elles tirent leur nom de leur forme pyramidale caractéristique, avec un corps cellulaire triangulaire et des dendrites qui s'étendent dans différentes directions. Ces cellules utilisent le glutamate pour communiquer avec d'autres neurones et sont impliquées dans la transmission des signaux excitateurs dans le cerveau. Le glutamate n'agit pas directement sur les cellules musculaires lisses pour produire une vasodilatation. En revanche, ce neurotransmetteur agit sur le débit sanguin en provoquant la libération de facteurs vasoactifs par les autres cellules de l'unité neurovasculaire. Les facteurs vasoactifs font l'objet de nombreuses études en neurobiologie et la compréhension de leurs interactions reste à compléter. En effet, ces agents vasoactifs peuvent être des ions (i.e. calcium et potassium), des molécules de signalisation (i.e. ATP, COX et

prostaglandines) ou des gaz (i.e. NO). Par ailleurs, le glutamate agit sur les neurones activés induisant une libération du vasodilatateur NO, et sur les astrocytes induisant une libération de calcium qui peut avoir un effet vasoconstricteur ou vasodilatateur (Drake et al., 2007; Lecrux et al., 2011; Schaeffer et al., 2021). Le couplage neurovasculaire commence avec l'activité synaptique du glutamate qui agit sur deux récepteurs principaux (NMDA: N-méthyl-D-aspartate et mGluR: récepteurs du glutamate) sur les neurones et les astrocytes, ce qui conduit à l'augmentation du calcium intracellulaire. Les fluctuations du calcium peuvent induire une dilatation des artérioles dans les régions activées ou dans les artérioles distantes grâce à la diffusion de cet ion à travers les jonctions communicantes (« gap junctions ») dans le réseau astrocytaire. Pendant l'activité neuronale, le potassium s'accumule dans le milieu extracellulaire. Cette accumulation déclenche une absorption du potassium par les astrocytes. Ensuite, les astrocytes libèrent ce potassium au niveau des vaisseaux sanguins. À faible concentration, le potassium induit une vasodilatation, mais à forte concentration, il induit une vasoconstriction (Drake et al., 2007; Cauli et al., 2018).

Un autre type de cellules nerveuses important dans le couplage neurovasculaire est constitué par les interneurones. Contrairement aux cellules pyramidales, les interneurones ont des axones et des dendrites relativement courts et communiquent généralement des signaux à courte distance. Ils établissent des connexions locales avec d'autres neurones dans leur voisinage immédiat. Les interneurones utilisent différents neurotransmetteurs, mais surtout le GABA. Le GABA agit comme inhibiteur en se liant aux récepteurs des neurones présynaptiques et postsynaptiques. Les signaux excitateurs provenant des cellules pyramidales stimulent l'activité des interneurones, qui, à leur tour, inhibent les cellules pyramidales. Cette boucle de rétroaction négative peut être considérée comme une forme de « frein » neuronal qui contribue à maintenir l'activité neuronale excitatrice dans les limites physiologiques et les quantités adéquates d'agents vasoactifs libérés (Drake et al., 2007; Lecrux et al., 2011). L'activité des interneurones est un élément clé de la régulation de l'activité neurovasculaire comme l'ont montré les travaux de notre collaborateur Bruno Cauli (CNRS/Sorbonne Université).

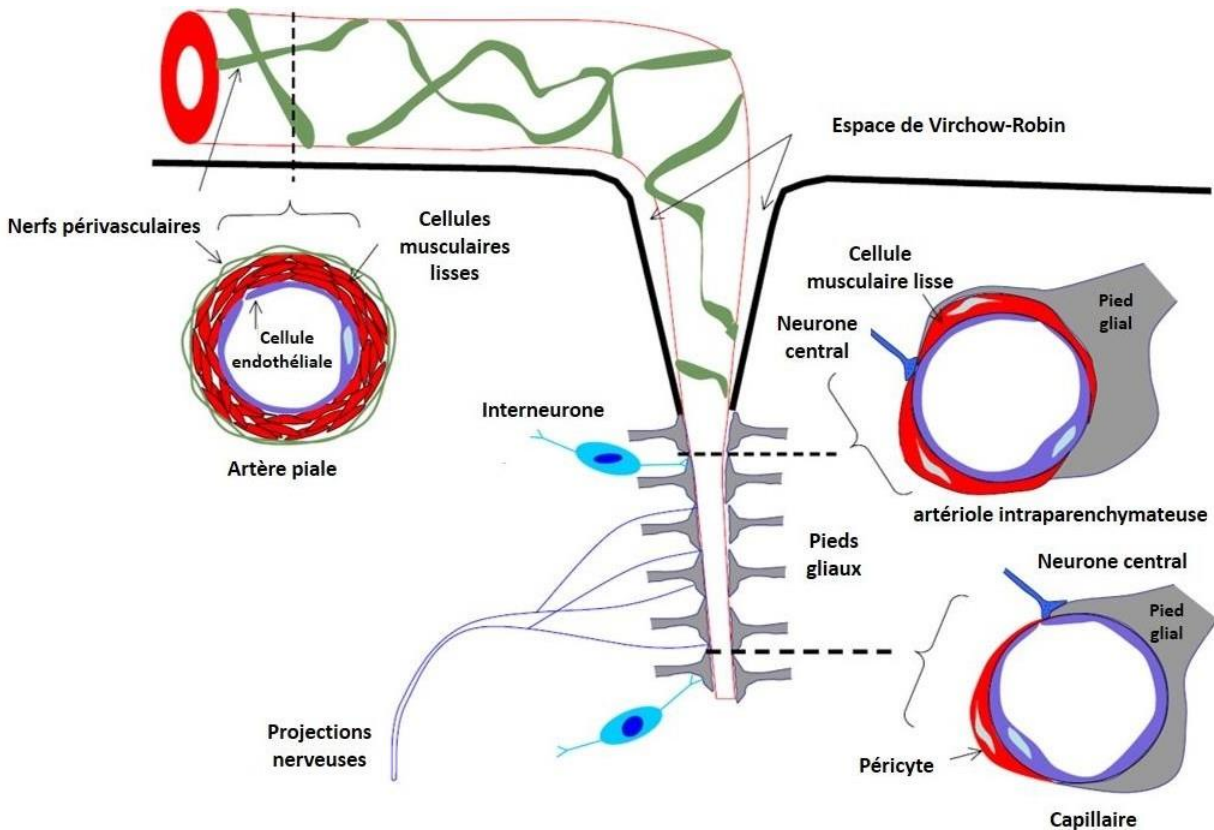


Figure V.6. Structure de l'unité neurovasculaire au niveau des différentes sections d'une artère cérébrale donnant naissance à une artériole. Les constituants cellulaires de l'unité varient en fonction du type, de la taille et de la localisation des vaisseaux sanguins. Des coupes transversales (lignes pointillées) sont représentées pour les artères piales, les artérioles intraparenchymateuses et les capillaires. Notamment, l'innervation des artères piales est assurée par les nerfs périphériques, tandis que les artérioles et les capillaires sont innervés par des neurones centraux (interneurones locaux et neurones de projection) et sont étroitement fixés par des pieds terminaux gliaux. Au niveau des circuits neuronaux, en profondeur, l'unité neurovasculaire est constituée de neurones, d'astrocytes, de cellules musculaires lisses ou de péricytes et de cellules endothéliales fonctionnellement couplées. (Adaptée de Drake et al., 2007)

4 DESCRIPTION ANATOMOFONCTIONNELLE DU CORTEX SOMATOSENSORIEL EN TONNEAUX

Comme les rongeurs sont des animaux nocturnes vivant dans des tunnels sous terre, leur système de vibrisses est adapté pour compenser l'absence d'informations visuelles. Les rongeurs utilisent leurs vibrisses comme un réseau de détecteurs de l'information tactile. Ils construisent ainsi des représentations spatiales de leur environnement leur permettant de localiser les objets dans l'espace et de discriminer entre les différentes textures. Le traitement somatosensoriel lié aux vibrisses est organisé en cartes qui occupent une grande partie de leur cerveau. Au sein du cortex somatosensoriel primaire en tonneaux, chaque vibrisse est représentée par une structure discrète et bien définie, une colonne corticale dénommée tonneau, en lien avec sa forme caractéristique

(Figure V.7). L'activité du cortex somatosensoriel primaire est liée à la perception sensorielle, l'expérience, l'apprentissage et la mémoire tactile. En outre, le fonctionnement des circuits corticaux chez les rongeurs est soumis à un contrôle rapide et puissant, générant un traitement sensoriel adaptatif très flexible au sein des mêmes réseaux neuronaux câblés. Ce système sensoriel est donc un modèle intéressant très étudié pour comprendre le traitement sensoriel et l'intégration sensorimotrice dans le contexte de comportements spécifiques liés à la déflexion des vibrisses (Petersen, 2003, 2007).

L'activation du cortex somatosensoriel en tonneaux suit un chemin neuronal complexe. La déflexion des vibrisses évoque des potentiels d'action dans les neurones sensoriels du nerf trijumeau, à la suite de l'ouverture de canaux ioniques mécanogènes dans les terminaisons nerveuses trigéminalées. Du glutamate est libéré au niveau d'une première synapse dans le tronc cérébral. Les neurones trigémino-thalamiques sont organisés en barrettes somatotopiques, chacune recevant l'information d'une seule vibrisse. Ensuite, les neurones du tronc cérébral relaient l'information sensorielle au thalamus, qui est également somatotopiquement organisé en unités anatomiques appelées baréloïdes, où une deuxième synapse glutaminergique excite les neurones thalamocorticaux qui se projettent vers le cortex somatosensoriel primaire en tonneaux (Figure V.7.A). La disposition des follicules des vibrisses sur le museau du rongeur est identique d'un rongeur à l'autre (schéma gauche de la Figure V.7.B). Dans la 4^{ème} couche du néocortex somatosensoriel primaire, il existe des structures anatomiques appelées tonneaux qui sont disposées selon un schéma presque identique à celui des vibrisses (schéma droit de la Figure V.7.B). La nomenclature standard pour les vibrisses et les tonneaux se base sur un groupe de lettre (A à E) précisant la ligne et un groupe de chiffres indiquant la colonne (1, 2, 3, etc.). Sur la figure, le follicule de la vibrisse C2 et le tonneau C2 correspondant sont marqués en jaune (Petersen, 2007).

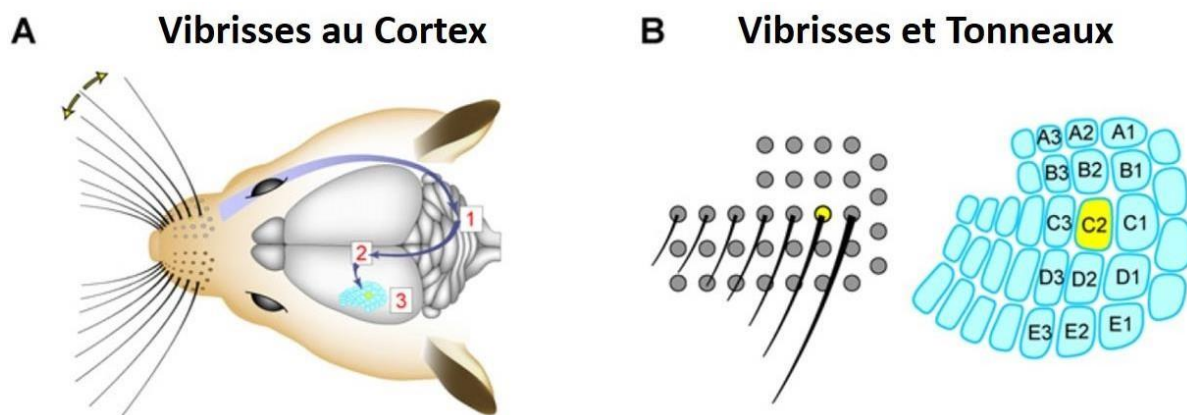


Figure V.7. Voies synaptiques pour le traitement des informations sensorielles liées aux vibrisses dans le cortex somatosensoriel en tonneaux chez les rongeurs. (A) Chemin anatomique des vibrisses au cortex: (1) tronc cérébral, (2) thalamus, et (3) cortex somatosensoriel primaire en tonneaux. (B) Disposition des follicules des vibrisses démontrant une somatotopie. (Adaptée de Petersen, 2007)

Chaque tonneau est entouré d'astrocytes et constitue un système approprié pour l'étude du couplage neurovasculaire. La variation de l'activité neuronale au niveau du couplage neurovasculaire induit une modification du CBF régional. En effet, le taux de variation du débit sanguin dans le cortex somatosensoriel en tonneaux dépend de plusieurs facteurs tels que la fréquence de la stimulation des vibrisses. En utilisant l'imagerie speckle, il a été montré que les caractéristiques spatiotemporelles de la réponse hémodynamique suite à la stimulation mécanique des vibrisses varient avec la fréquence de stimulation (Figure V.8). La stimulation la plus intense et la plus étendue est observée pour une fréquence de 3 Hz (Lau et al., 2005).

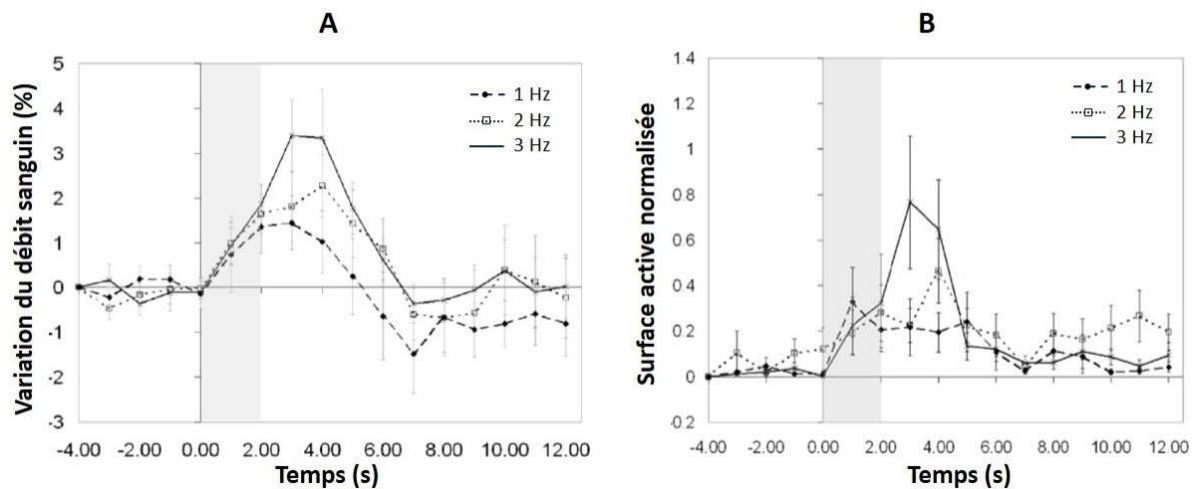


Figure V.8. Effet de la fréquence du stimulus sur la réponse hémodynamique mesurée par S-LSCI. (A) Variations du débit en fonction du temps. (B) Zone d'activation obtenue à partir du nombre de pixels dont la variation du débit sanguin est supérieure à la réponse demi-maximale. L'instant $t = 0$ correspond au déclenchement de la stimulation. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard. (Adaptée de Lau et al., 2005)

Néanmoins, les études montrent que la réponse hémodynamique à la stimulation des vibrisses est loin d'être instantanée et un délai de plusieurs secondes est nécessaire pour l'atteinte du taux de variation maximale des paramètres hémodynamiques. Ce retard de variation du débit sanguin par rapport à l'activité neuronale est souvent expliqué par les délais nécessaires pour la libération et la diffusion des médiateurs neurovasculaires dans les différentes structures impliquées dans le couplage neurovasculaire. D'autre part, la disparité de la réponse aux différentes fréquences de stimulation est due à un recrutement d'un nombre variable de cellules. Ceci implique que le temps nécessaire pour atteindre le pic dépend aussi du nombre d'entrées synchrones recrutées et de l'intégration spatiotemporelle de ces entrées (Lau et al., 2005).

5 PROTOCOLE D'OBTENTION DU MODÈLE ANIMAL DE L'OBÉSITÉ

Il existe principalement deux modèles animaux d'obésité chez les rongeurs: le premier modèle repose sur une modification génétique spontanée chez l'animal centré sur la leptine, tandis que le second modèle, induit par l'alimentation, reproduit un métabolisme énergétique perturbé plus proche de ce qui est observé chez l'humain. Par rapport aux modèles génétiques centrés sur la signalisation liée à la leptine et à l'étude de l'hyperglycémie (souris ob/ob déficientes en leptine, ou db/db déficientes pour les récepteurs de la leptine), les modèles induits par alimentation reflètent la composante nutritionnelle des cas d'obésité observés chez l'homme et constituent une cible privilégiée pour divers essais thérapeutiques.

Pour obtenir un bon modèle de « Diet Induced Obesity » (DIO) chez la souris, il est nécessaire de considérer plusieurs facteurs essentiels. Tout d'abord, les différentes souches de rongeurs répondent différemment aux régimes gras, par exemple les DBA2 prennent rapidement du poids et en plus grande masse que les C57BL6 (Thorens et al., 2019), mais le comportement sensoriel, notamment olfactif, somatosensoriel et cognitif des souris C57BL6 est meilleur. L'autre facteur majeur est l'existence d'une gamme de régimes commerciaux obésogènes qui rendent plus ou moins efficacement les rongeurs obèses, comme les régimes riches en gras ou « High Fat Diet » (HFD; 45 ou 60 % de kcal provenant des graisses mais moins de 20 % provenant du sucrose; Figure V.9) et les régimes occidentaux « Western Diet » (WD, en plus des 60 % de kcal dues aux lipides, 30 % de l'énergie environ provient du sucrose) (pour revue Bastías-Pérez et al., 2020). Il existe même une intravariabilité au sein d'un même régime (Speakman, 2019), ce qui implique que l'environnement de l'animal dans sa cage (enrichissement) et le lien aux animaliers peuvent aussi être des facteurs très importants. Dans le cadre de cette thèse, des souris C57BL6/J ont été utilisées vu que cette souche de souris développe un phénotype assez proche du syndrome métabolique humain (obésité, hyperinsulinémie, résistance à l'insuline) lorsqu'elles sont nourries avec un régime hypercalorique de type HFD (Collins et al., 2004). Cependant, chez le rongeur, le pancréas ne s'épuise jamais comme chez l'humain, et nous parlons plutôt d'un état prédiabétique, l'état diabétique de l'humain étant caractérisé par une chute des quantités circulantes d'insuline après plusieurs années d'obésité couplée au DT2.

L'expérimentation animale *in vivo*, y compris les techniques d'imagerie fonctionnelle, sont soumises à des directives éthiques européennes. Cela signifie que les biologistes soumettent, avant toute expérimentation animale, un dossier de projet éthique détaillant toutes les étapes des travaux à effectuer sur animaux vivants à un comité éthique qui donne son autorisation et un numéro officiel contrôlé par les vétérinaires. Toutes les études animales de cette thèse ont donc été réalisées avec l'approbation du comité d'éthique de Buffon (CEEA40), sous l'accord n°751317 du ministère de la recherche. Toutes les souris ont été hébergées dans une pièce maintenue à $22 \pm 1^\circ\text{C}$ avec la lumière allumée de 7h à 19h (horaire lumière-obscurité 12h/12h). Les souris étaient placées collectivement

Chapitre V. Étude de la variation du débit sanguin cérébral chez les souris obèses par MESI en exposition synthétique

par quatre en cage pour respecter leur vie sociale, avec du coton pour faire leur nid, un tunnel en carton pour leur activité d'exploration et un morceau de bois à ronger. Tous les animaux de cette étude ont été habitués à des manipulations quotidiennes pour diminuer leur anxiété. Des souris mâles C57BL/6J âgées de quatre semaines ont été achetées (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France). À leur arrivée au laboratoire, les souris ont été nourries sous régime standard (régime A04, 3145 kcal/kg, Safe, Augy, France) pendant une semaine pour s'acclimater à leur nouveau lieu de vie. Ensuite, les souris du groupe obèse ont été nourries *ad libitum* avec un régime riche en graisses (régime HF246 4972 kcal/kg, Safe, Augy, France), le groupe témoin continuant à recevoir une alimentation standard (régime A04) pendant toute la durée de l'étude. Le poids corporel des animaux a été mesuré tout au long de l'étude, une fois par semaine entre 9h et 10h. La composition de la masse corporelle (quantité de masse maigre et de masse grasse) a été évaluée à l'aide d'un appareil Echo Medical Systems EchoMRI 100 (EchoMRI, Houston, TX, USA) à la 16^{ème} semaine.

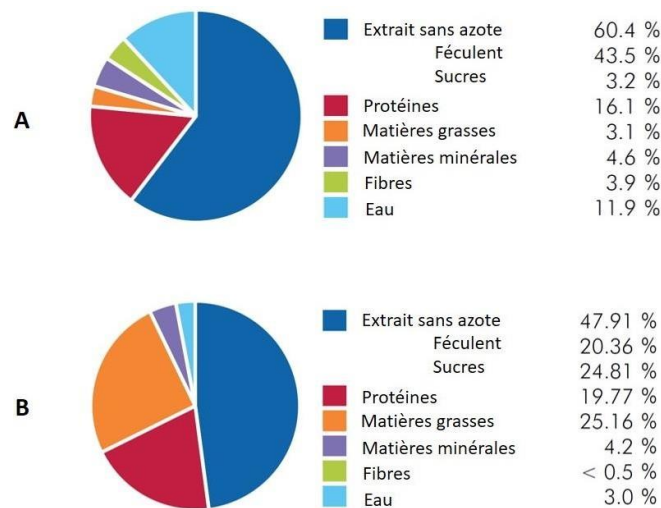


Figure V.9. Composition détaillée des régimes alimentaires utilisés dans les expériences de cette thèse. (A) Régime standard A04. (B) Régime gras HF246. (www.safe-lab.com)

Le phénotype des souris obèses est obtenu après 12 semaines sous le régime HFD (Figure V.10). Le poids moyen des souris obèses est de 39.0 ± 3.1 g et significativement plus élevé que les 29.1 ± 2.1 g du groupe témoin.

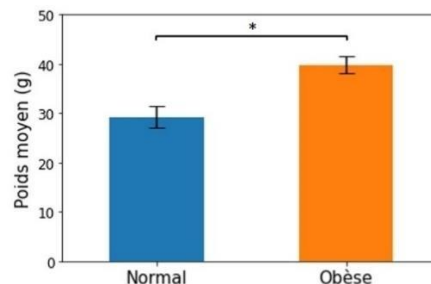


Figure V.10. Comparaison du poids corporel entre les souris témoins et les souris obèses nourries par régime hyperlipidique pendant 12 semaines. Une différence de poids significative est observée (n = 6 pour chaque groupe).

les souris obèses et $n = 6$ pour les souris témoins; * $p = 0.002 < 0.005$, test non paramétrique de Mann Whitney).

6 VALIDATION DE L'EXPOSITION SYNTHÉTIQUE *IN VIVO*

Le but de cette partie est de comparer les deux méthodes du MESI, la méthode d'exposition synthétique et la méthode d'exposition modulée, pour valider l'emploi de la technique d'exposition synthétique pour le MESI et justifier son utilisation dans la suite de cette thèse. Dans la section III.3, nous avons montré l'équivalence entre les deux types d'exposition *in vitro*; cette section représente la validation *in vivo* de la technique MESI à exposition synthétique.

6.1 PRÉPARATION DES ANIMAUX POUR LA CHIRURGIE

Dans cette première partie de l'étude *in vivo*, le but est de comparer les deux techniques d'exposition pour le MESI: l'exposition synthétique et l'exposition modulée. Pour cela, nous avons choisi de travailler avec des souris sous régime standard ($n = 6$) de poids moyen $m = 25.2 \pm 2.5$ g et d'âge moyen de 12 semaines.

Nous avons utilisé le mélange de Kétamine (Imalgène, 75 g/kg) ajouté à la Médétomidine (Domitor, 0.5 g/kg) comme combinaison d'anesthésiant-analgésiant. Une dizaine de minutes après injection intrapéritonéale du mélange, la souris est entrée dans un état d'inconscience. Avant de commencer la chirurgie, il était important de s'assurer que l'anesthésie ait fait effet: la souris est complètement immobile et ses vibrisses ne bougent plus. Le niveau d'anesthésie était contrôlé tout au long de l'expérience par pincement à la patte (et rétraction si l'état anesthésié faiblissait) et ajusté par réinjection si nécessaire. Pendant toute la durée de l'expérience, la souris était placée sur un matelas chauffant thermostaté qui maintenait la température mesurée par voie rectale à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Après l'anesthésie, la tête de l'animal a été rasée pour éviter toute contamination par les poils du corps pendant l'imagerie. La souris a été placée dans un cadre stéréotaxique adapté à sa tête (Narishige, Japon) comprenant une barre buccale et des barres auriculaires assurant l'immobilité totale de l'animal pendant l'imagerie. Pour accéder au cortex somatosensoriel en tonneaux, la surface du cerveau de la souris a été libérée de l'os par trépanation locale. Ceci est dû au fait que les souris sont adultes âgées de plusieurs mois et l'os est assez épais, rendant difficile l'accès aux vaisseaux sanguins pour une imagerie la plus nette possible. La peau a été incisée. La surface du crâne a été découverte et nettoyée des poils et des tissus conjonctifs liés à l'os. L'os du crâne situé au-dessus du cortex somatosensoriel en tonneaux a été enlevé pour permettre la mise en place d'une fenêtre optique. Pour se repérer à la surface du crâne, les coordonnées stéréotaxiques du cortex somatosensoriel en tonneaux sont relevées dans l'Atlas de Paxinos et Watson (coordonnée AntéroPostérieure: $-0.5/1$ mm, coordonnée MédioLatérale: $3.5/4.5$ mm). Pour affiner l'os afin de faciliter son extraction, nous avons utilisé une fraise de dentiste pour réduire l'épaisseur de l'os par passages successifs, toujours dans le même sens. Vu que cette manœuvre produit de la chaleur et des micro-saignements, l'os doit donc être régulièrement refroidi et protégé par l'utilisation

d'éponges de gélatine imbibées d'eau physiologique. Lorsque les vaisseaux sanguins étaient visibles à travers l'os, une ouverture d'environ $3 \times 3 \text{ mm}^2$ a été pratiquée en utilisant un scalpel au-dessus du cortex somatosensoriel. Lorsque l'os s'est détaché et s'est désolidarisé du reste du crâne, il a été soulevé délicatement en glissant la pointe du scalpel sous l'os. La dure-mère, le plus épais des méninges, a été alors retiré en veillant à ne pas endommager les vaisseaux sanguins sous-jacents. Une fois l'os retiré, les tissus exposés ne sont plus maintenus et bougent sous l'effet de la respiration et des battements du cœur, ce qui peut produire des artefacts de mouvements gênant l'imagerie. Nous sommes conscients que l'imagerie à travers la dure-mère serait préférable car elle permettrait de conserver une intégrité du réseau vasculaire et sa physiologie, mais sa présence dégrade souvent la qualité des images par diffusion, absorption des photons et superposition d'une figure de speckle fixe intense. Sans dure-mère, le contact direct avec l'air peut dessécher et endommager les tissus. Afin de minimiser ces effets indésirables, ainsi que les mouvements du cerveau dus à la respiration, l'ouverture a été remplie d'un gel d'agarose à 1 % (référence A9793-50G, Sigma-Aldrich). La surface de l'agarose qui a pris en masse a été ensuite recouverte d'une fine lamelle de verre adaptée à la taille de la craniotomie, ce qui limite l'hétérogénéité des angles d'incidence et de réflectance des photons. La lamelle et la gélose peuvent être changées, si besoin, en cours d'expérience sans endommager le tissu.

6.2 PROTOCOLE D'ACQUISITION

Les systèmes d'imagerie MESI à exposition modulée (section III.2.1) et à exposition synthétique (section III.2.2) ont été utilisés pour l'évaluation du débit sanguin *in vivo*. Les images de contraste speckle à différents temps d'exposition ont été obtenues selon les méthodes de calcul décrites dans les sections III.2.3 et III.2.4.3 pour l'exposition modulée et l'exposition synthétique respectivement. Les acquisitions ont été faites avec la caméra Orca-Flash 2.8 (Hamamatsu, Massy, France) et la diode laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$, 200mW, SGL, Shanghai, Chine). La caméra est montée sur un stéréomicroscope Leica (MZ16FA; objectif 10445819; distance de travail = 6 cm). Le faisceau laser a été dirigé vers la tête de l'animal à l'aide d'un miroir. La puissance du laser arrivant sur la tête de la souris est de l'ordre de quelques dizaines de mW/cm^2 , valeur considérée sans risque selon les études de sécurité laser (Nourhashemi et al., 2016). L'ouverture numérique est fixée à $\text{ON} = 0.28$ et le grandissement à $G = 3.3$. Dans ces conditions, le champ de vue vaut $2 \times 1.5 \text{ mm}^2$. Pour réduire le bruit dû à la lumière ambiante, toutes les expériences ont été réalisées en lumière éteinte. La Figure V.11 montre les deux systèmes d'imagerie MESI utilisés. Les données de contraste MESI obtenues sont ensuite ajustées au modèle mathématique de l'Équation III.21 pour extraire le temps de décorrélation τ_c , mesure indirecte du débit sanguin.

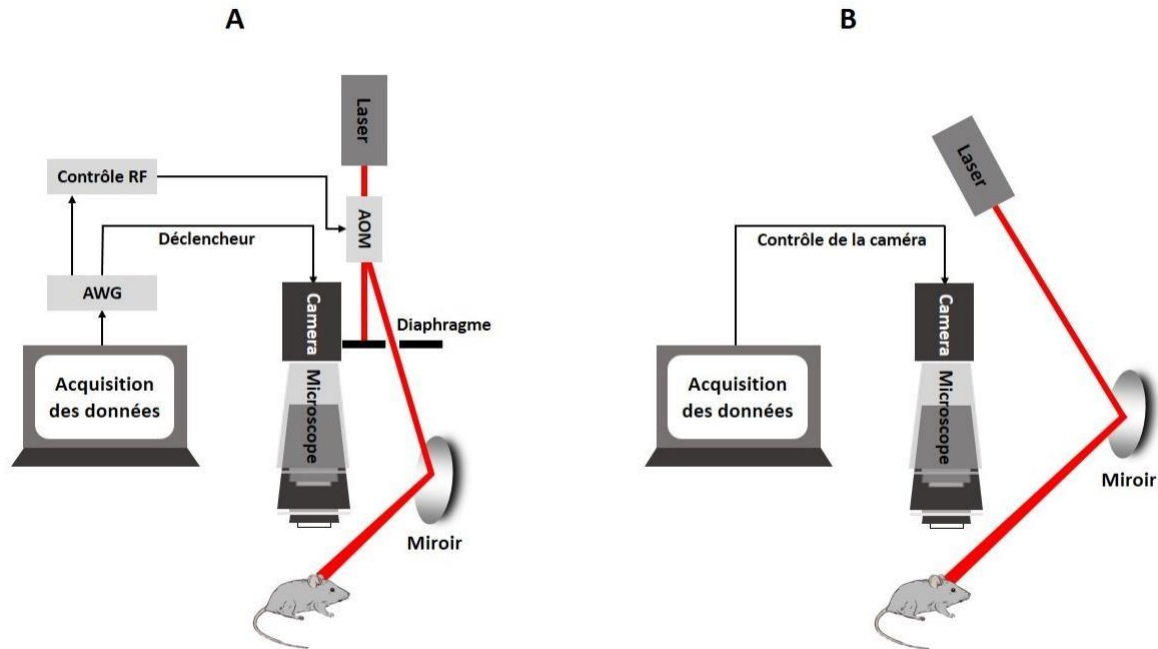


Figure V.11. Architecture du dispositif MESI. (A) Système d'imagerie MESI à exposition modulée. AWG: Générateur de signaux. Contrôle RF: contrôle radiofréquence. AOM: Modulateur Acousto-Optique. (B) Système d'imagerie MESI à exposition synthétique.

6.3 PROTOCOLE D'ANALYSE DES DONNÉES

Suite à l'acquisition des images de speckle brutes en utilisant les deux approches MESI (Figure V.11), les images de contraste speckle sont calculées en se basant sur la technique d'exposition modulée et la technique d'exposition synthétique et leurs approches de correction de bruits associées détaillées dans les sections III.2.3 et III.2.4.3. Sur chaque souris, nous avons relevé les valeurs du contraste pour les différents temps d'exposition et ceci sur tous les vaisseaux possibles. La même ROI est utilisée pour la mesure du contraste pour les deux modes d'acquisition. Les données de contraste sont ensuite ajustées au modèle mathématique non-linéaire MESI (Équation III.21) pour extraire les valeurs de τ_c correspondantes. Le paramètre ρ est fixé à une valeur constante (estimée par l'ajustement non-linéaire aux données MESI en exposition modulée puis utilisée pour l'ajustement non-linéaire aux données MESI en exposition synthétique) pour un même vaisseau vu que ce paramètre représente la quantité de diffuseurs mobiles qui est censée être indépendante du mode d'acquisition.

6.4 COMPARAISON DE L'EXPOSITION SYNTHÉTIQUE À L'EXPOSITION MODULÉE *IN VIVO*

Les données ont été acquises séquentiellement dans les deux modes d'exposition modulée et synthétique. Pour cette étude, les mesures ont été faites sur l'ACA (Artère Cérébrale Antérieure) vu que l'expérience ne requiert pas de stimulation sensorielle. L'évolution du contraste speckle en

fonction du temps d'exposition pour les deux approches MESI est représentée sur la Figure V.12.B. Nous considérons deux ROI sur deux vaisseaux de différents calibres: le diamètre du vaisseau #1 (V1) vaut $49 \mu\text{m}$ et celui du vaisseau #2 (V2) vaut $23 \mu\text{m}$. En exposition modulée ou synthétique, nous observons un contraste plus élevé dans le vaisseau de plus petit calibre (V2). Ceci est cohérent avec le fait que plus le vaisseau est petit, plus le temps de décorrélation est faible τ_c ce qui se traduit par un contraste speckle plus élevé. Par contre, les valeurs du contraste obtenues en exposition synthétique sont sensiblement plus faibles quelque soient le temps d'exposition, avec une différence plus marquée pour le vaisseau de plus grand diamètre.

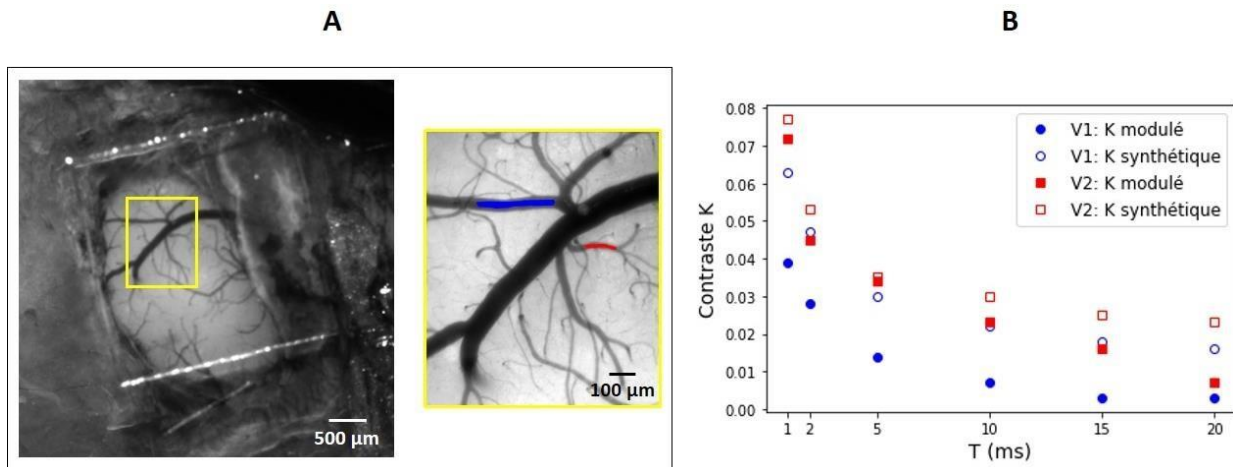


Figure V.12. Comparaison du contraste speckle dans différents calibres de vaisseaux sanguins pour les deux approches du MESI. (A) Image macroscopique de référence en lumière verte. L'encadré jaune montre la zone d'intérêt ($G = 3.3$). (B) Évolution du contraste speckle en fonction du temps d'exposition pour les deux approches du MESI: le 1^{er} vaisseau (V1) de $49 \mu\text{m}$ de diamètre est représenté avec les symboles vides; le 2^{ème} vaisseau (V2) de $23 \mu\text{m}$ est représenté par les symboles pleins. La couleur bleue est utilisée pour l'exposition modulée tandis que la couleur rouge est utilisée pour l'exposition synthétique.

Les valeurs de contraste mesurées pour les deux modes d'exposition ont été utilisées pour extraire le temps de décorrélation. Les valeurs de τ_c ont été mesurées sur 40 vaisseaux sanguins différents sur cinq souris (une souris a été éliminée de l'étude due à un problème d'illumination lors de l'acquisition des données). La Figure V.13.A montre la variation du τ_c estimé par la méthode d'exposition synthétique ($\tau_{\text{synthétique}}$) en fonction de celui estimé par la méthode d'exposition modulée ($\tau_{\text{modulée}}$). Les temps de décorrélation mesurés sont compris entre 0 et 1.8 ms, ce qui est représentatif de ce qui a été observé *in vivo* chez la souris en utilisant une mesure directe de la fonction d'autocorrélation de l'intensité $g_2(\tau)$ (Postnov et al., 2020). L'ajustement linéaire sur ces données montre une forte corrélation positive entre ces deux variables avec un R^2 de 0.81. La normalisation par le diamètre des vaisseaux sanguins proposées pour tenir compte des diffusions multiples (Kazmi et al., 2015b; Soleimanzad, 2018) améliore encore plus la relation de linéarité ($R^2 = 0.90$; Figure V.13.B). Cette normalisation est valable, quelle que soit la méthode d'acquisition, sous l'hypothèse que dans un même vaisseau le nombre de diffusions est semblable. En comparant les valeurs de τ_c entre les deux modes d'acquisition, nous remarquons que la

méthode d'exposition synthétique n'est pas équivalente à la méthode modulée car la pente n'est pas égale à 1 mais de 0.66, les temps de décorrélation estimés pour les données MESI synthétique étant globalement inférieurs à ceux obtenus à partir des données MESI modulées. Nous attribuons cette différence à plusieurs facteurs qui restent à explorer: un échantillonnage temporel différent entre les deux méthodes ou des biais dans la correction des bruits pour l'une ou l'autre des méthodes. Bien que la technique synthétique ne permette pas la quantification absolue des temps de décorrélation, la mesure des variations relatives du débit dans la gamme considérée est possible du fait de la linéarité de la relation entre les temps de décorrélation. Il faut souligner de nouveau que les méthodes S-LSCI ou MESI en l'état permettent seulement la mesure « relative » du débit sanguin. La Figure V.13.C présente la distribution des vaisseaux sanguins résolus par la technique d'imagerie speckle et sur lesquels nous avons fait les mesures de τ_c . Le calibre des vaisseaux correspond à celui des artères de petits diamètres dont la dimension se situe entre celle des grandes artères (i.e. artères piales) et des petites artérioles (Tableau II.1, Chapitre II). La Figure V.13.D montre la variation des τ_c en fonction du diamètre du vaisseau pour les deux modes d'acquisition. La variabilité biologique fait que les valeurs de τ_c sont dispersées dans l'espace. Par contre, il est clair qu'une tendance décroissante du τ_c en fonction du diamètre du vaisseau existe pour l'exposition synthétique ainsi que pour l'exposition modulée comme attendu (Wang et al., 2016).

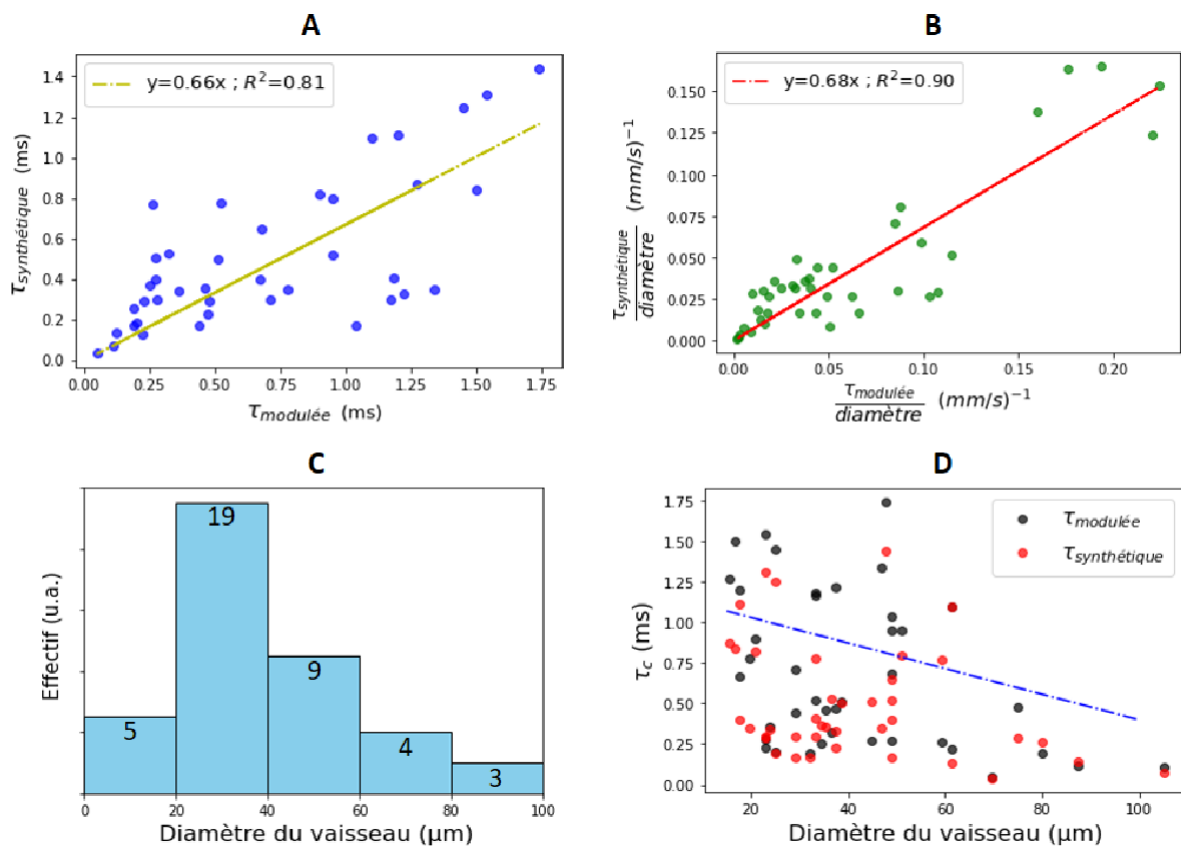


Figure V.13. Comparaison des temps de décorrélation estimés par les deux approches du MESI. (A) Graphique montrant la distribution du $\tau_{\text{synthétique}}$ en fonction du $\tau_{\text{modulée}}$. (B) Graphique montrant la distribution des temps de décorrélation des deux modes d'acquisition après normalisation par les diamètres

des vaisseaux. (C) Histogramme montrant le nombre de vaisseaux sanguins triés selon la taille du diamètre. (D) Graphique montrant l'évolution du temps de décorrélation en fonction du diamètre des vaisseaux pour les deux modes d'acquisition.

7 VARIATION DE LA RÉPONSE HÉMODYNAMIQUE INDUITE PAR STIMULATION DES VIBRISSES DANS LE CORTEX SOMATOSENSORIEL EN TONNEAUX DES SOURIS OBÈSES COMPARÉES AUX SOURIS TÉMOINS

L'obésité est associée à une altération du couplage neurovasculaire (Tucsek et al., 2014; Tarantini et al., 2018) engendrant une réduction du débit sanguin dans les modèles précliniques, comme l'équipe l'a montré précédemment dans le cadre de la thèse d'Haleh Soleimanzad sur le bulbe olfactif (Soleimanzad et al., 2020). Une démonstration a aussi été faite en clinique sur le cortex préfrontal (Willeumier et al., 2011). Dans cette partie nous cherchons à démontrer ces observations en utilisant l'approche MESI synthétique (validée *in vitro* dans le Chapitre III) et le traitement d'images par le réseau de neurones Res3D-Net (implémenté dans le Chapitre IV) comme alternative à l'ajustement non-linéaire des données MESI (Équation III.21). À cet effet, nous comparons la réponse hémodynamique suite à une stimulation mécanique des vibrisses dans deux groupes de souris en nous focalisant sur le segment principal de la MCA, irrigatrice du cortex somatosensoriel en tonneaux, ceci chez des souris obèses sous régime HF246, et des souris témoins sous régime standard A04 (cf. section V.5). Le Res3D-Net a été ré-entraîné après conversion des valeurs de débit de la base de données expérimentale en valeurs de vitesse équivalente (cf. Tableau A.1 de l'annexe) et régénération des cartes cibles de vitesse. Le but de cette conversion est d'obtenir des cartes en mm/s à la sortie du réseau de neurones.

7.1 PROTOCOLE DE STIMULATION DU CORTEX SOMATOSENSORIEL EN TONNEAUX

La réponse hémodynamique à la stimulation mécanique des vibrisses de la souris dépend de plusieurs facteurs tels que la direction angulaire dans laquelle les vibrisses sont déplacées, l'ordre dans lequel les vibrisses sont déviées, la combinaison particulière des vibrisses stimulées ainsi que leur nombre. Cette variabilité est nécessaire pour les rongeurs pour pouvoir identifier les objets à proximité, leur direction et leur vitesse de déplacement, ainsi que leur texture (Simons, 1985).

Nous avons décidé de stimuler l'ensemble des vibrisses pour diminuer les variabilités physiologiques provenant de la forte capacité analytique du système somatosensoriel. Nous avons effectué la stimulation des vibrisses à l'aide d'un microcontrôleur Arduino. La carte Arduino est connectée à la sortie déclenchement TTL de la caméra ainsi qu'à un servomoteur qui pilote le mouvement d'un coton-tige de 7 cm utilisé pour la stimulation des vibrisses. Le coton-tige effectue des rotations de $\pm 60^\circ$ autour de la position centrale horizontale. La stimulation est faite de sorte à parcourir toutes les vibrisses d'un côté latéral dans les deux sens verticaux (vers le haut puis vers

le bas); les images sont alors acquises sur le côté opposé en respect de la latéralisation cérébrale. La stimulation mécanique se fait à une fréquence de 2 Hz pendant 80 secondes: 20 secondes de référence, 30 secondes de stimulation puis 30 secondes de retour au repos (Figure V.14). Cette opération a été répétée cinq fois, avec un espacement de quatre minutes entre deux stimulations consécutives. Ceci permet d'obtenir plusieurs essais par souris vu que la réponse hémodynamique n'est pas censée différer entre les différents essais dans ces conditions expérimentales (Ma et al., 1996).

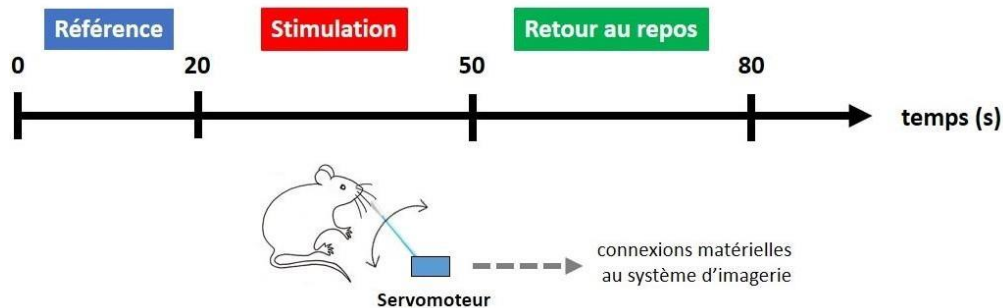


Figure V.14. Schéma du protocole de stimulation des vibrisses.

L'acquisition des images dure 80 secondes pour pouvoir suivre le déroulement temporel du flux sanguin tout au long du protocole de stimulation et de retour au repos. À la fin de l'acquisition, l'enregistrement obtenu est un film de 4000 images par essai.

7.2 PROTOCOLE D'ANALYSE DES DONNÉES

Après l'acquisition des images speckle brutes lors de la stimulation des vibrisses de la souris, un protocole d'analyse des données est appliqué pour en extraire la variation temporelle du flux sanguin en passant par l'ajustement non-linéaire.

Étape 1: Calcul des images de contraste speckle en se basant sur la technique d'exposition synthétique et la correction des bruits associée détaillée dans les sections III.2.3. et III.2.4. Le calcul est fait sur tout le film de 4000 images pour pouvoir récupérer le déroulement temporel.

Étape 2: Division des données de contraste speckle en trois parties (référence, stimulation et retour au repos). Ensuite, deux filtres convolutifs sont appliqués sur la dimension temporelle pour le débruitage: un filtre médian glissant de taille $z = 15$ (pour éliminer les variations extrêmes) suivi d'un filtre de moyenne de taille $z = 5$. Cette étape permet d'éliminer les mouvements importants et d'obtenir un déroulement temporel relativement lisse des valeurs de contraste (Park et al., 2008). La taille des filtres a été choisie de façon à avoir un déroulement temporel lissé adaptée pour l'application de l'ajustement non-linéaire (sensible aux petites variations) et d'éviter un décalage temporel dans la courbe de suivi de la réponse hémodynamique au cours de la stimulation.

Étape 3: Sélection d'une ROI qui couvre toute la branche principale de la MCA. Extraction des données de contraste moyen mesurées sur cette ROI pour les différents temps d'exposition.

Étape 4: Ajustement non-linéaire du modèle MESI sur les données de contraste pour extraire les valeurs du τ_c sur toute la durée du protocole de stimulation. A chaque instant t , nous associons sept valeurs de contraste correspondants aux sept temps d'exposition qui vont servir à l'extraction d'une valeur de τ_c pour l'instant t .

Étape 5: Calcul du temps de décorrélation inverse (ICT).

Étape 6: Calcul de la variation maximale de l'ICT (Δ ICT) durant la stimulation par rapport à la valeur moyenne de l'ICT durant la phase de référence. La valeur moyenne de l'ICT durant la phase de référence est calculée en moyennant toutes les valeurs de l'ICT de cette phase. La valeur de Δ ICT est normalisée par rapport à la valeur moyenne de l'ICT dans la phase de référence et est exprimée en pourcentage.

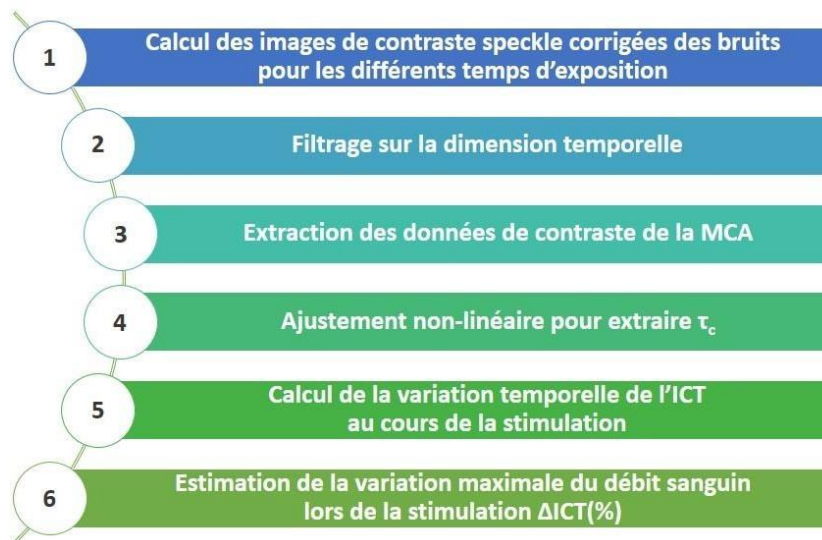


Figure V.15. Diagramme résumant les étapes principales pour le calcul de la cinétique du paramètre Δ ICT et sa valeur maximale lors d'un essai de stimulation des vibrisses.

Pour mesurer la variation de la vitesse du sang lors de la stimulation sensorielle à l'aide du réseau de neurones, plusieurs étapes de l'analyse changent. Le calcul des films de contraste speckle reste inchangé. Une fois les films de contraste calculés pour les sept temps d'exposition, ces piles d'images sont présentées comme des cubes de données successifs en entrée du réseau de neurones Res3D-Net. Le réseau prédit à partir des films de contraste les cartes de vitesse du sang pour toute la durée du protocole de stimulation. Enfin, nous calculons (en %) la variation relative maximale de la vitesse (ΔV) par rapport à la valeur moyenne de la vitesse durant la phase de référence.

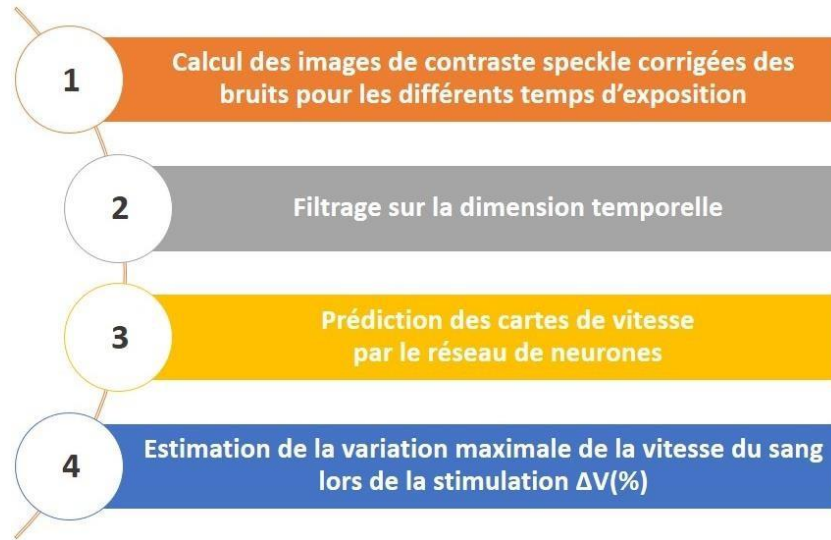


Figure V.16. Diagramme résumant les étapes principales de mise en forme et d'analyse de des données par le réseau Res3D-Net pour le calcul de ΔV maximale lors de la stimulation.

7.3 COMPARAISON DE LA RÉPONSE HÉMODYNAMIQUE ENTRE LES GROUPES DE SOURIS SUITE À LA STIMULATION DU CORTEX SOMATOSENSORIEL EN TONNEAUX

Les données enregistrées sur les deux groupes de souris témoins et obèses sous régime HFD (cf. section V.5) ont été analysées pour évaluer l'impact d'obésité sur la variation du débit sanguin dans la MCA suite à la stimulation des vibrisses. Au cours d'une expérience, plusieurs essais consécutifs sont faits sur chacune des souris. Le choix des essais retenus est fait avant tout filtrage. Parmi les cinq essais de stimulations, les essais retenus sont ceux qui montrent une variation temporelle du contraste speckle au cours de la phase de stimulation sensorielle. Une souris est éliminée si moins de deux essais vérifient ce critère. Pour chaque souris deux à quatre essais ont été retenus. Au final, les deux groupes témoin et obèse comptent chacun quatre souris.

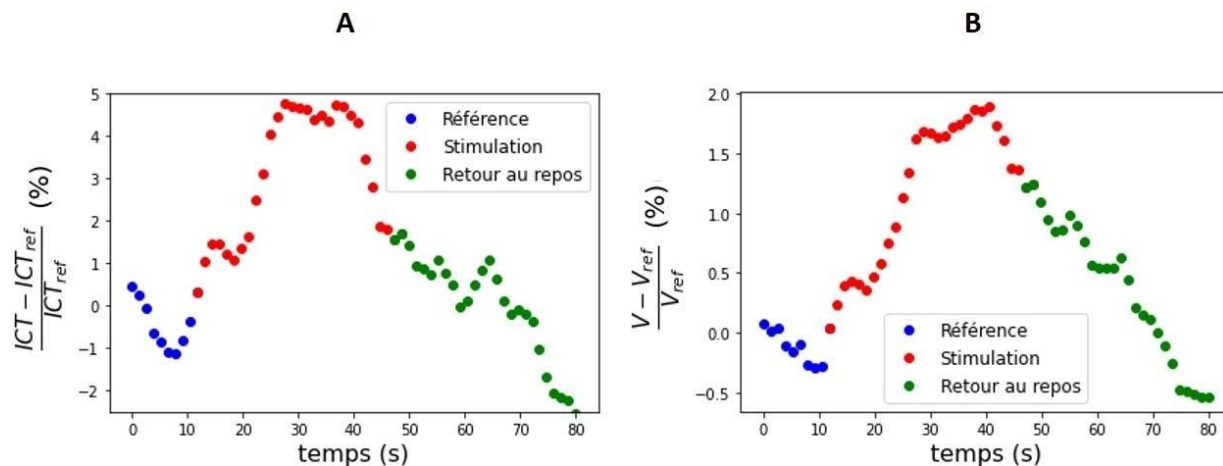
	Groupe témoin	Groupe obèse
N initial	6	6
N retenu	4	4
Nombre d'essais retenus	10	12

Tableau V.1. Nombre de souris et d'essais retenus.

Nous avons comparé la réponse hémodynamique entre les deux groupes de souris et ceci par la méthode d'ajustement non-linéaire (mesure d'ICT) et par l'utilisation du réseau de neurones (mesure de vitesse). Pour éviter tout biais lié à la position de la ROI, nous avons fait les mesures d'ICT et de vitesse en utilisant les mêmes ROIs. À noter que la mesure de variation de la réponse hémodynamique est faite dans tous les cas uniquement sur la MCA et non sur d'autres artérioles. Le décours temporel des réponses hémodynamiques enregistrées montre une fluctuation de ΔICT et de ΔV avant même le début de la stimulation (Figure V.17). Cette fluctuation est une fluctuation

physiologique normale nécessaire pour la régulation du flux local dans le voisinage neuronal (Li et al., 2000). Dès que la stimulation mécanique commence, nous observons une augmentation du ΔICT et du ΔV qui atteignent leurs valeurs maximales après 20 s environ. La durée nécessaire pour atteindre le maximum de la réponse hémodynamique dépend de plusieurs facteurs physiologiques liés aux mécanismes physiologiques impliqués (libération des substances vasoactives, intégration spatiotemporelle des signaux, etc.) dans le couplage neurovasculaire (Villringer et al., 1995; Lau et al., 2005). Ceci fait de la variation du flux sanguin un processus progressif. Ensuite, ΔICT et ΔV commencent à décroître vers le seuil de référence du flux sanguin. Les fluctuations du flux sanguin observées durant la stimulation, ainsi que la décroissance qui débute avant la fin du protocole de stimulation ont déjà été observées dans des études précédentes (Ma et al., 1996). Ces fluctuations peuvent provenir de l'échange sanguin dans le réseau vasculaire où le sang diffuse en gradient selon les besoins métaboliques des différentes zones. Une hypothèse est que la décroissance anticipée du flux, avant la fin de la stimulation sensorielle, serait due à un dépassement (« overshoot ») des besoins du réseau neurovasculaire. Par ailleurs, durant la phase de retour au repos, un passage sous la ligne base (« undershoot ») est observé. Ce phénomène est également considéré aussi comme un phénomène hémodynamique de régulation du couplage neurovasculaire (Rosengarten et al., 2002).

En comparant les décours temporels extraits de l'ajustement non-linéaire (Figure V.17.A) et de l'analyse par réseau de neurones (Figure V.17.B), nous remarquons une différence dans les variations relatives de la réponse hémodynamique, en particulier au niveau du maximum enregistré, systématiquement plus faible pour l'analyse par réseaux de neurones. Ce point est discuté plus tard (section VI.2). Bien que les valeurs maximales ne soient pas identiques, il est important de noter qu'une forte corrélation positive (coefficient de Pearson $r = 0.93$) est observée entre les deux décours temporels. Ceci montre une consistance des deux techniques pour la détection des variations relatives du flux sanguin.



l'analyse par réseau de neurones. (La corrélation entre ces deux courbes a été évalué en calculant le coefficient de Pearson $r = 0.93$).

La Figure V.18 montre la comparaison de la réponse hémodynamique entre les deux groupes de souris respectivement sous régime hyperlipidique (obèses) et sous régime standard (normopondérées) avec les deux méthodes d'analyse. Les mesures de Δ ICT et de Δ V ont été faites sur les mêmes ROI positionnées toujours sur la MCA. En se basant sur la méthode d'ajustement non-linéaire, la variation relative maximale de l'ICT lors de la stimulation des vibrisses chez les souris témoins est de 6.7 ± 2.1 % contre 4.3 ± 2.0 % pour les souris obèses. D'autre part, pour l'analyse par réseau de neurones, la variation relative maximale de la vitesse du sang chez les souris témoins vaut 3.2 ± 1.4 % contre 1.5 ± 1.6 % pour les souris obèses. En utilisant l'une ou l'autre des méthodes d'analyse, la variation maximale de la réponse hémodynamique chez les souris obèses reste significativement plus faible que celle chez les souris témoins (test non paramétrique de Mann-Whitney, * $p < 0.05$). Ces données suggèrent que le flux sanguin dans la MCA qui irrigue le cortex somatosensoriel en tonneaux est dérégulé chez les souris obèses.

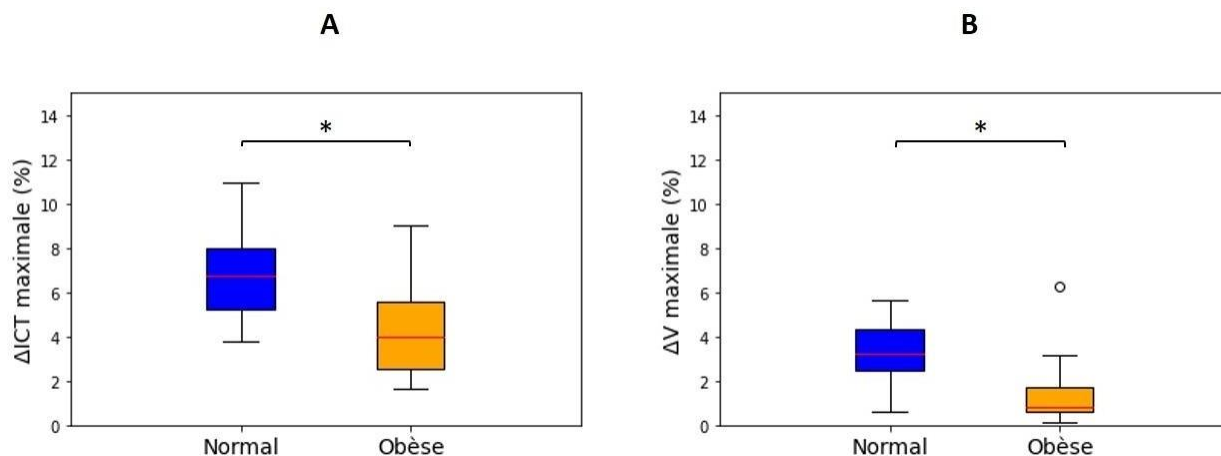


Figure V.18. Comparaison de la réponse hémodynamique de la MCA entre les souris obèses et les souris contrôles. (A) Variation maximale relative de l'ICT durant la stimulation par rapport à la valeur moyenne de référence de l'ICT. Les valeurs sont extraites de la méthode d'ajustement non-linéaire. (B) Variation maximale relative de la vitesse durant la stimulation par rapport à la valeur moyenne de référence de la vitesse. Les valeurs sont extraites de l'analyse par réseau de neurones. (Test non paramétrique de Mann-Whitney; * $p < 0.05$)

7.4 EFFET DE LA SUPPLÉMENTATION EN DHA SUR LA RÉPONSE HÉMODYNAMIQUE

La supplémentation en acides gras polyinsaturés (AGPI), comme l'acide docosahexaénoïque ou DHA, constitue une voie pour la protection du couplage neurovasculaire dans le cerveau contre la toxicité induite par l'obésité. Elle permet d'obtenir un équilibre entre AGPI ω -6 et ω -3. Dans le régime hyperlipidique, ce rapport dépasse 10. Avec la supplémentation en DHA, un AGPI ω -3, il est possible de le faire revenir à un rapport adéquat de 1. Pour tester cette hypothèse, nous avons

comparé la réponse hémodynamique à la stimulation des vibrisses des souris témoins et obèses sous régime HFD-1 (présentées dans la section V.5) à un groupe de souris obèses (n = 6) aussi sous régime HFD mais avec un rapport $\frac{\omega-6}{\omega-3} = 1$, donc une supplémentation en DHA (soit le régime HFD-2). Les souris du groupe HFD-2 avait le même âge (4 mois environ) que les souris des autres groupes avec un poids moyen de $m = 45.1 \pm 2.1$ g. La Figure V.19 montre la différence de poids corporel, des masses grasse et maigre et de la glycémie à jeun entre trois groupes de souris (chacun comptant sept souris) sous régime standard, HFD-1 et HFD-2. Ces données montrent une masse corporelle et une masse grasse plus élevées chez les groupes de souris obèses comparés au groupe normal, ainsi qu'une masse maigre relativement plus élevée dans ce dernier groupe (Figure V.19.A). La mesure de la glycémie à jeun montre une tendance prédiabétique chez les souris obèses comparées aux souris témoins; cette glycémie est légèrement plus faible chez les souris sous HFD-2 comparées aux souris sous HFD-1 (Figure V.19.B).

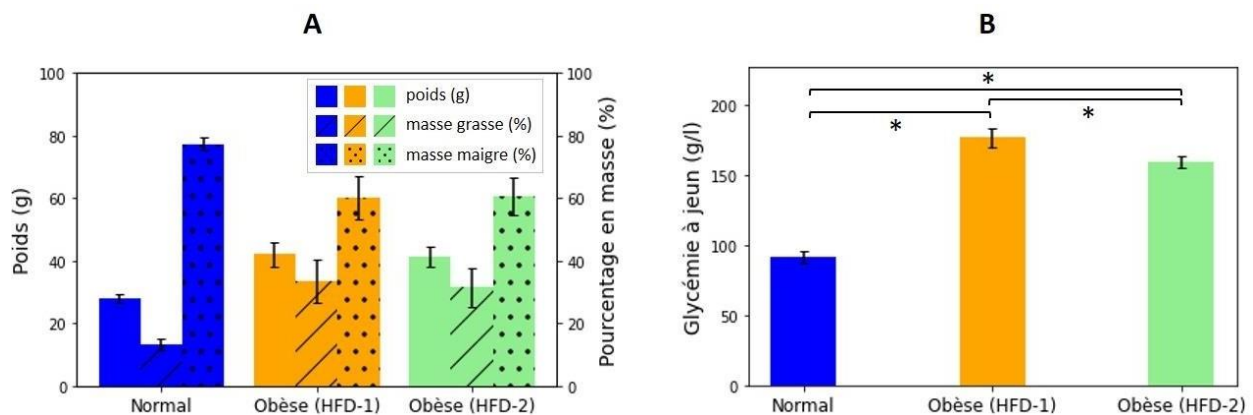


Figure V.19. Comparaison du poids corporel, des masses grasse et maigre et de la glycémie à jeun entre les trois groupes de souris (souris régimes standard, HFD-1 et HFD-2). (A) Graphique montrant la différence de poids et de pourcentage en masse grasse et maigre des souris. Pour ces trois paramètres, une différence significative est observée uniquement entre le groupe sous régime standard et chacun des groupes obèses (test non paramétrique de Mann-Whitney; $p < 0.05$). Les deux groupes obèses ne montrent pas de différence significative quant aux paramètres mesurés. (B) Les trois groupes de souris montrent une différence significative quant à la mesure de la glycémie à jeun (test non paramétrique de Mann-Whitney; $* p < 0.05$). À noter que, ces données proviennent d'une autre étude (non publiée de l'équipe REGLYS au laboratoire BFA) utilisant la même souche de souris et sont extraites au même âge de souris que celles montrées dans notre étude *in vivo*.

La Figure V.20 montre la comparaison de la réponse hémodynamique entre les souris sous régime standard, les souris obèses sous régime HFD-1 et les souris obèses sous régime HFD-2 avec les deux méthodes d'analyse (ajustement non-linéaire et réseau de neurones). En se basant sur la méthode d'ajustement non-linéaire, la variation relative maximale de l'ICT lors de la stimulation des vibrisses chez les souris témoins est de 6.7 ± 2.1 % contre 4.3 ± 2.0 % pour les souris sous HFD-1 et 4.6 ± 1.2 % pour les souris sous HFD-2; une différence significative a été observée entre les souris témoins et les deux groupes de souris obèses. D'autre part, pour l'analyse par réseau de neurones, la variation relative maximale de la vitesse du sang chez les souris témoins vaut $3.2 \pm$

1.4 % contre 1.5 ± 1.6 % pour les souris obèses sous HFD-1 et 2.5 ± 1.0 % pour les souris obèses sous HFD-2. En utilisant l'analyse par réseau de neurones, la variation relative de la vitesse du sang chez les souris obèses sous HFD-2 se montre, d'abord, significativement plus élevée que celle chez les souris sous HFD-1, et aussi, statistiquement non-différente de la variation de la vitesse sanguine chez le groupe témoin. Malgré la différence des mesures entre les méthodes d'analyse, la variation maximale du flux sanguin chez les souris témoins reste plus élevée, en valeur absolue, que celle chez les souris obèses indépendamment du régime HFD adopté. Néanmoins, l'augmentation de la réponse hémodynamique chez les souris sous HFD-2, en comparaison aux souris sous HFD-1, est probablement le signe d'une amélioration du couplage neurovasculaire suite à la supplémentation en ω -3.

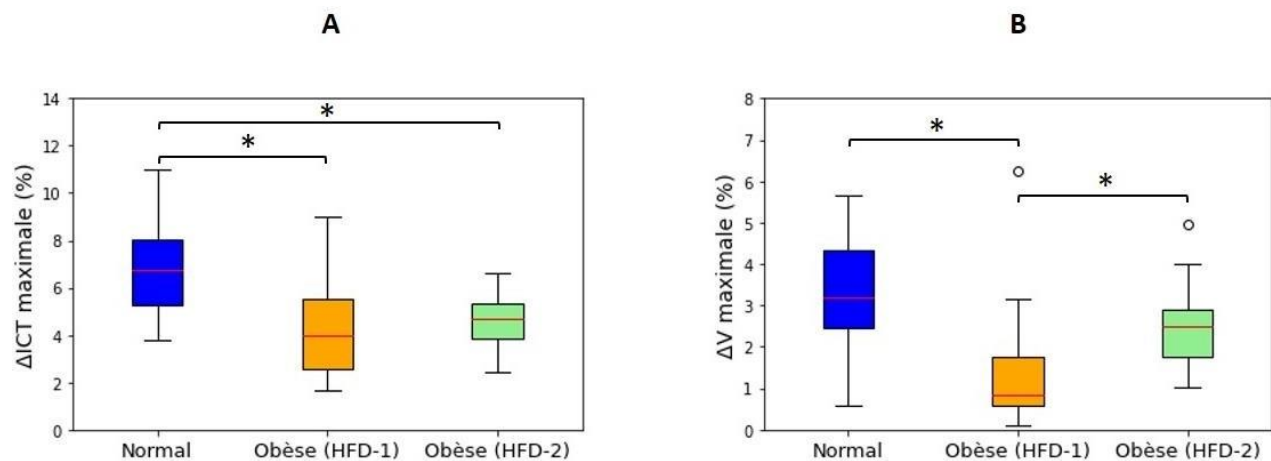


Figure V.20. Comparaison de la réponse hémodynamique enregistrée sur la MCA entre les souris sous régime standard, les souris obèses sous régime HFD-1 et les souris obèses sous régime HFD-2 (DHA). (A) Variation maximale relative de l'ICT durant la stimulation par rapport à la valeur moyenne de référence de l'ICT. Les valeurs sont extraites de la méthode d'ajustement non-linéaire. (B) Variation maximale relative de la vitesse durant la stimulation par rapport à la valeur moyenne de référence de la vitesse. Les valeurs sont extraites de l'analyse par réseau de neurones. (Test non paramétrique de Mann-Whitney; * $p < 0.05$)

CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons abordé l'obésité et les comorbidités qui lui sont associées en préclinique et en clinique. Expérimentalement, nous avons reproduit partiellement la pathologie métabolique par un régime obésogène basé sur une alimentation en lipides saturés toxiques, et un rapport déséquilibré entre acides gras polyinsaturés (délétères ω -6 *versus* protecteurs ω -3). Afin d'examiner les variations hémodynamiques au cours de l'obésité, nous avons d'abord validé l'emploi de la technique MESI à exposition synthétique chez des souris sous régime standard en la comparant avec la technique traditionnelle MESI à exposition modulée. Ensuite, nous avons enregistré la variation du flux sanguin lors de la stimulation mécanique des vibrisses *in vivo* chez des souris témoins et obèses de même âge par la technique MESI à exposition synthétique. Les données MESI enregistrées lors de la stimulation du cortex somatosensoriel en tonneaux ont montré une réduction de la réponse hémodynamique chez les souris obèses comparées au groupe témoin, ce qui est en accord avec les articles de la littérature. De façon intéressante, le rétablissement du rapport entre ω -3 et ω -6 par l'addition de DHA dans la nourriture grasse semble aboutir à une récupération partielle de l'hyperémie fonctionnelle. Ces résultats prouvent la validité de la technique MESI à exposition synthétique qui est capable de suivre l'évolution temporelle du débit sanguin cérébral. De même, nous avons évalué deux approches pour l'extraction de la réponse hémodynamique: l'ajustement non-linéaire, méthode traditionnelle pour le MESI, et une nouvelle approche basée sur les réseaux de neurones convolutifs. Les deux méthodes d'analyse étaient capables d'extraire une différence significative de la réponse hémodynamique entre les différents groupes de souris. Le chapitre suivant présente la discussion et la mise en perspectives de ces résultats.

CHAPITRE VI. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1	Instrumentation et méthodologie de l'imagerie MESI en exposition synthétique	160
1.1	Contribution des bruits en fonction des conditions expérimentales	160
1.2	Défis liés à l'échantillonnage temporel	161
1.3	Recommandations pour l'imagerie MESI en exposition synthétique	162
2	Approche par réseau de neurones pour l'extraction du débit sanguin	163
2.1	Avantages des réseaux de neurones par rapport à l'ajustement non-linéaire	163
2.2	Atouts de l'emploi de données expérimentales pour l'entraînement des réseaux de neurones	166
3	Physiologie	168
3.1	Altération de la réponse hémodynamique chez les souris obèses	168
3.2	Approches possibles pour le rétablissement de l'hyperémie fonctionnelle	169
	Au-delà de l'imagerie du débit sanguin cérébral	171

1 INSTRUMENTATION ET MÉTHODOLOGIE DU MESI EN EXPOSITION SYNTHÉTIQUE

1.1 CONTRIBUTION DES BRUITS EN FONCTION DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Le montage d'imagerie MESI utilise une caméra sCMOS (Orca-Flash 2.8) pour l'acquisition des données. Malgré les spécifications techniques modestes de cette caméra en termes de bruits et de sensibilité par rapport aux caméras plus récentes, la faisabilité de l'acquisition MESI en exposition synthétique avec cette caméra a été validée. Il est évident qu'une efficacité spectrale plus élevée et des bruits d'obscurité et de lecture plus faibles réduiraient encore la contribution du bruit au contraste speckle, mais la principale contribution du bruit au contraste speckle provient du bruit de grenaille dont la contribution relative dépend de la profondeur des puits du capteur et de la possibilité d'illuminer suffisamment le tissu pour se placer en limite de saturation de la caméra. Une propriété que nous avons initialement négligée est l'hétérogénéité des pixels en bruit d'obscurité et de lecture ainsi qu'en sensibilité. En effet, dans les caméras CMOS, la conversion « charge-tension » est indépendante pour chaque pixel, et chaque colonne possède son propre amplificateur et convertisseur analogique-numérique, en plus des variations possibles de l'EQ d'un pixel à l'autre. La sortie « brute » du capteur inclut la variabilité pixel à pixel du bruit de lecture, du gain électronique, du bruit d'obscurité, qui sont corrigés par le fabricant dans la plupart des caméras sCMOS (Watanabe et al., 2017). Par conséquent, les caméras CMOS standards présentent généralement un FPN et un PRNU important qui peuvent biaiser le calcul local du contraste spatial, en particulier aux temps d'exposition longs. Même pour des caméras sCMOS bien corrigées, la somme de nombreuses images pour obtenir les temps d'exposition longs en imagerie synthétique impose l'évaluation de ces bruits et leurs corrections. En première approche, une soustraction d'images de bruit d'obscurité et de lecture obtenues en imagerie synthétique, en l'absence de source lumineuse, permet d'éliminer une partie de la variabilité induite par ces bruits. Bien que des installations d'imagerie speckle ont été mises en œuvre avec des caméras à performances modérées y compris des webcams, il est peu probable qu'une telle approche permette une imagerie MESI non biaisée en exposition synthétique (Richards et al., 2013). Par ailleurs, comme nous l'avons vu (section III.3.3), la contribution relative du bruit de grenaille au contraste speckle est maximale lorsque le niveau d'illumination n'est pas optimal et lorsque les débits observés sont élevés. Pour les faibles temps d'exposition le niveau de signal détecté peut être sous-optimal du fait d'une limitation de la puissance de la source, tandis que les temps d'exposition plus longs en bénéficient de l'addition d'images en imagerie synthétique. Pour les applications cliniques, la contribution du bruit de grenaille sous un faible éclairage pourrait être problématique, surtout que les contraintes pratiques et de sécurité imposent l'utilisation d'une faible puissance laser, répartie sur un large champ de vue limitant la quantité de signal disponible (Richards et al., 2017; Zilpelwar et al., 2022). Cette difficulté explique les temps d'exposition longs utilisés par les systèmes S-LSCI commerciaux. Les flux lents observés dans les petites artérioles, les capillaires et le

parenchyme entraînent une décorrélation lente des grains de speckle ce qui minimise la contribution relative des bruits. Au contraire, l'imagerie de flux rapides tels que ceux observés dans les artères ou les grandes artéριοles est beaucoup moins favorable, car la décorrélation rapide du speckle entraîne de faibles valeurs du contraste. Concrètement, l'imagerie des flux rapides nécessite des temps d'exposition courts inférieur à la milliseconde, ce qui pourrait conduire à un éclairage non optimal. Pour l'application clinique de l'imagerie MESI, au-delà de la simplification de l'instrumentation, l'exposition synthétique pourrait être particulièrement intéressante par rapport à l'exposition modulée en diminuant la contribution relative du bruit de grenaille au contraste speckle pour les longs temps d'exposition nécessaires pour détecter les petites variations du débit sanguin. Néanmoins, l'intérêt essentiel de l'imagerie speckle par rapport aux autres techniques d'imagerie clinique du système vasculaire réside dans sa capacité à fournir une cartographie fonctionnelle de la microcirculation. Nous pourrions donc envisager une utilisation séquentielle des modalités d'imagerie complémentaires avec d'abord une imagerie macroscopique Doppler ultrasons par exemple, associée dans un second temps à l'imagerie speckle dédiée aux vaisseaux de petites dimensions et de faibles flux. Dans le même ordre d'idée, l'association à l'imagerie speckle de la cartographie de l'oxygénation des tissus par des méthodes optiques est relativement facile à envisager (Jones et al., 2008; Bouchard et al., 2009; Yudovsky et al., 2011; Giannoni et al., 2018) et apporterait certainement des informations complémentaires dans un contexte pathologique.

1.2 DÉFIS LIÉS À L'ÉCHANTILLONNAGE TEMPOREL

La fréquence d'images limitée et le délai inter-images (Δt) non négligeable qui en résulte constituent une forte limitation de l'approche MESI par exposition synthétique, implémentée avec la caméra Orca-Flash 2.8. En effet, Δt doit être maintenu à la valeur la plus courte possible afin de fournir un échantillonnage temporel précis de la fonction d'autocorrélation $g_2(\tau)$. L'approche par exposition modulée permet d'échantillonner correctement l'évolution de la décorrélation des grains de speckle vu que les données de chaque exposition sont contiguës, avec un Δt nul. De même, dans la littérature, les mises en œuvre de l'exposition synthétique MESI utilisent, (i) des détecteurs SPAD avec une vitesse et une sensibilité élevées mais un nombre très limité de pixels (Dragojević et al., 2018) ou, (ii) des capteurs CMOS couplés à une carte FPGA permettant des fréquences d'images de 15 kHz (Sun et al., 2015) ou 1 kHz (Hultman et al., 2018b) respectivement avec des Δt négligeables (quelques μs) par rapport aux temps de décorrélation des globules rouges. Pour les détecteurs SPAD, la sommation des images est possible avec une correction des bruits, mais le nombre de pixels est faible (32 x 32 pixels dans les implémentations les plus abouties Xu et al., 2022) et ne permet pas une imagerie de haute résolution spatiale. Pour les systèmes CMOS, l'acquisition des données MESI à ces cadences a été réalisé avec du matériel spécifique, sur mesure, basé sur l'interfaçage direct de capteurs rapides avec des FPGA dédiés, ce qui va à l'encontre de notre objectif de simplifier l'instrumentation du système MESI pour faciliter son adoption en milieu clinique.

En MESI, la résolution temporelle finale pour la mesure du débit sanguin est la durée totale d'acquisition des différentes images multi-exposition nécessaire pour obtenir une valeur du temps de décorrélation τ_c . En exposition modulée, elle dépend du nombre de temps d'exposition utilisés et de la durée du temps d'exposition le plus long qui définit l'exposition constante de la caméra. Pour six temps d'exposition utilisés, i.e. allant de 1 à 20 ms, la durée totale de l'acquisition des données nécessaire à l'évaluation d'un temps de décorrélation est d'environ 120 ms (6 x 20 ms). En exposition synthétique, la résolution temporelle est limitée par la fréquence d'images maximale de la caméra. Dans notre mise en œuvre, la fréquence d'images se situe entre 46 (plein champ) et 714 images/s (ROI de 50 x 50 pixels), correspondant à des Δt respectifs de 21.2 et 0.4 ms. Ceci conduit à une résolution temporelle d'environ 423 ms et 28 ms respectivement pour 20 images acquises à $T = 1$ ms. Une résolution de 423 ms est une résolution temporelle grossière, mais elle se situe dans l'ordre de grandeur du temps caractéristique des changements physiologiques du débit sanguin. Effectivement, l'augmentation locale du débit sanguin cérébral est initiée généralement dans les 0.5 à 1 s suite à la stimulation somatosensorielle (Dunn et al., 2005; Jones et al., 2008; Khan et al., 2011). De plus, nos données expérimentales indiquent qu'une partie de la décorrélation est bien capturée malgré un échantillonnage temporel sous-optimal, car la comparaison avec les données acquises en exposition modulée montre une relation linéaire entre les temps de décorrélation dérivés des deux méthodes d'acquisition MESI pour les mêmes débits. Bien que la quantification absolue des temps de décorrélation soit hors de portée, la mise en œuvre du MESI en exposition synthétique avec notre caméra permet de mesurer les changements relatifs de débit sanguin sur une gamme de temps de décorrélation représentatifs des données biologiques *in vivo* obtenues par mesure directe de l'autocorrélation (Postnov et al., 2020).

1.3 RECOMMANDATIONS POUR L'IMAGERIE MESI EN EXPOSITION SYNTHÉTIQUE

L'imagerie MESI en exposition synthétique bénéficie d'une mise en œuvre instrumentale simple comparée à l'approche modulée. Concernant le choix de la caméra, une caractéristique essentielle est un bruit faible, stable et uniforme, ainsi qu'une sensibilité élevée et une réponse homogène du capteur. De plus, un éclairage optimal, homogène et stable est nécessaire pour garantir que toute la dynamique de la caméra est utilisée et réduire la contribution du bruit de grenaille, surtout dans des conditions défavorables souvent rencontrées pour l'étude hémodynamique dans les tissus vivants. Il est beaucoup plus facile de garantir un éclairage constant pendant toute la durée d'acquisition des temps d'exposition en mode d'exposition synthétique qu'en exposition modulée. En effet, pour la modulation du laser, l'intensité de chaque impulsion doit être étalonnée à l'avance sur un objet de référence. Cette modulation doit être codée au niveau matériel à l'aide d'un AWG pour moduler l'intensité de chaque impulsion laser. Cette étape d'étalonnage entraîne des différences dans les intensités d'éclairage détectées lors de l'imagerie de tissus biologiques *in vivo* vu que le tissu exposé présente des propriétés optiques et des formes hétérogènes inconnues *a priori*. La vitesse de synchronisation et de lecture de la caméra est également un paramètre essentiel. Comme indiqué dans la section VI.1.2, le délai inter-images, Δt , doit être réduit au

minimum. En théorie, Δi doit être au moins deux fois plus court que le temps de décorrélation τ_c mesuré pour garantir un échantillonnage temporel correct de la décorrélation du speckle. Dans notre mise en œuvre, le délai inter-images et la résolution temporelle globale sont limités par la fréquence d'acquisition de la caméra. La réduction de la taille de l'image acquise a permis d'augmenter la fréquence d'images et, par conséquent, de réduire Δi à 0.4 ms. Une évolution importante de notre dispositif constituerait à utiliser une caméra plus rapide et non bruitée afin de diminuer le temps d'exposition synthétique, par exemple jusqu'à 0.5 ms voir 0.1 ms, tout en augmentant la vitesse d'acquisition au-delà de 100 à 200 images/s. Pour les caméras sCMOS actuelles, une zone d'intérêt de 300 x 300 pixels permet d'obtenir des fréquences d'images allant jusqu'à 900 Hz pour un temps d'exposition de 1 ms. Des fréquences d'images aussi élevées correspondent à un délai inter-images de 0.1 ms et respecteraient mieux le théorème de Shannon-Nyquist pour l'échantillonnage temporel de la décorrélation du débit sanguin *in vivo*. Elles permettraient aussi de réduire le temps d'exposition (en augmentant le nombre d'images nécessaire à sommer pour obtenir les temps d'exposition longs) et donc une meilleure sensibilité aux débits élevés. Néanmoins, cela implique de générer et transférer de grandes quantités de données, et donc d'utiliser des standards d'acquisition adaptés comme les caméras coaXExpress. Pour une telle caméra, avec une fréquence d'échantillonnage élevée et un temps d'exposition plus court, il serait *in fine* intéressant de comparer les données MESI et les temps de décorrélation qui en découlent avec l'approche modulée, afin d'évaluer si les différences observées dans la thèse (valeurs de contraste et temps de décorrélation plus élevés en MESI synthétique) sont atténuées par un meilleur échantillonnage temporel.

2 APPROCHE PAR RÉSEAU DE NEURONES POUR L'EXTRACTION DU DÉBIT SANGUIN

2.1 AVANTAGES DES RÉSEAUX DE NEURONES PAR RAPPORT À L'AJUSTEMENT NON-LINÉAIRE

Malgré sa meilleure quantification des variations du débit sanguin par rapport à la S-LSCI, la technique MESI souffre de la nécessité d'acquérir plusieurs images d'exposition suivies d'un ajustement non-linéaire pixel par pixel à un modèle multiparamétrique. L'acquisition MESI peut être complexe en particulier en contexte clinique où la priorité est donnée au protocole standard (Richards et al., 2017) et l'analyse ultérieure des données est longue, et coûteuse en temps de calcul, plusieurs minutes étant nécessaire pour l'analyse d'une seule carte de débit. Or la plupart des protocoles cliniques reposent sur un « challenge » vasculaire avec, par exemple, le gonflement d'un brassard pour réduire transitoirement le débit. L'information pertinente est alors dynamique: c'est le temps de retour à une perfusion normale. Il est donc nécessaire d'analyser une série d'images consécutives, avant, pendant et après l'interruption provoquée de la circulation (Dunn et al., 2011; Mazhar et al., 2011; Farraro et al., 2016). Par conséquent, la plupart des systèmes de laboratoire et tous les systèmes commerciaux d'imagerie speckle pour les applications précliniques ou cliniques dynamiques reposent encore sur la méthode S-LSCI (Pape et al., 2001; Hecht et al.,

2009, 2016; Sharif et al., 2012; Della Rossa et al., 2013; Eriksson et al., 2014; Mennes et al., 2019; Liu et al., 2022). Une approche pour l'estimation rapide des temps de décorrélation à partir de l'ajustement non-linéaire a été très récemment proposée. Cette méthode consiste à utiliser une fonction modifiée de l'ajustement non-linéaire en estimant les différents paramètres dans un ordre prédéfini. Néanmoins, la connaissance de la microcirculation sous-jacente reste nécessaire pour le choix du modèle d'ajustement convenable (Rivera et al., 2023). L'approche par réseaux de neurones avait déjà été abordée en amont de nos travaux (Fredriksson et al., 2019) mais, avec un réseau de neurones pas nécessairement optimal et sans être réellement validée pour l'analyse de la microcirculation à l'échelle des artérioles et capillaires (cf. section IV.3.2).

Dans nos travaux, la comparaison des cartes de flux sanguin obtenues à l'aide de l'approche CNN et de l'approche d'ajustement non-linéaire montre une distribution similaire des flux sanguins relatifs. L'approche CNN présente plusieurs avantages par rapport à l'approche d'ajustement non-linéaire. Premièrement, le CNN ne nécessite pas une implémentation pixel par pixel coûteuse en temps de calcul. Le traitement d'une image de 700 x 700 pixels avec le Res3D-Net prend environ 0.4 s, ce qui réduit le temps de traitement d'un facteur de 3115 par rapport à l'ajustement non-linéaire pixel par pixel dans une implémentation Python utilisant la même configuration matérielle d'ordinateur. En effet, le temps de calcul du Res3D-Net tombe en dessous de 1 s à partir de trois cœurs utilisés, ce qui évite d'avoir recours à une configuration matérielle complexe pour effectuer les calculs nécessaires. Dans ce cas le rapport des temps de traitement d'une image de 700 x 700 pixels est d'environ 7000 encore plus favorable à l'approche par réseaux de neurones. Cette rapidité ouvre la voie à l'analyse MESI en temps quasi-réel. Deuxièmement, le modèle d'ajustement non-linéaire est sensible au bruit expérimental des données et au choix des paramètres initiaux de l'ajustement ainsi qu'aux temps d'exposition utilisés (en effet, plus les temps d'expositions utilisés sont faibles, plus le modèle de décorrélation des grains de speckle est capturé correctement). Par conséquent, il ne converge pas pour tous les pixels, ce qui oblige à définir de grandes zones d'intérêt pour calculer la moyenne des valeurs de contraste des pixels voisins. En revanche, les cartes de flux sanguin dérivées du CNN présentent des valeurs relatives cohérentes et homogènes pour les pixels voisins. Troisièmement, l'approche CNN ne repose pas sur un modèle *a priori* de la manière dont le contraste speckle est lié au temps de décorrélation. En effet, dans l'ajustement non-linéaire, le modèle est généralement fondé sur l'hypothèse d'une décroissance exponentielle de la fonction de décorrélation du champ $g_1(\tau)$, en supposant que le régime d'écoulement est soit à diffusion unique non ordonnée, soit à diffusion multiple ordonnée. *In vivo*, les deux modèles coexistent avec une proportion variable selon la zone cérébrale et les régimes d'écoulement différent dans les artérioles, les capillaires ou le parenchyme (Postnov et al., 2020). Idéalement, la fonction d'ajustement devrait être adaptée à chaque pixel du champ de vision en tenant compte du régime d'écoulement local. En pratique, un seul modèle est appliqué à l'ensemble des pixels, pour des raisons de simplicité d'implémentation mais également la non-connaissance *a priori* du modèle adéquat à appliquer à chaque pixel (C. Liu et al., 2021). Ceci entraîne des erreurs significatives dans l'estimation des temps de décorrélation et donc des variations du débit sanguin. Dans ces contextes, des efforts théoriques récents ont proposé une approche « sans

modèle » (Zheng et al., 2022) basée sur une nouvelle définition du contraste de speckle et une relation directe analytique permettant de calculer τ_c sans ajustement non-linéaire. Le calcul est alors très rapide de l'ordre de 0.1 s pour une carte de vitesse en plein champ. Cette approche a été validée *in vitro* et *in vivo* à condition que la condition d'ergodicité soit satisfaite, ce qui est rarement le cas *in vivo*. En présence de diffuseurs statiques, la méthode requiert des hypothèses supplémentaires et ne peut donc plus être considérée *stricto sensu* comme « sans modèle ». Une autre approche encore très récente « REMI » pour « Rapid Estimation of Multiple exposure Imaging » propose d'utiliser une méthode optimisée de régression non-linéaire sur modèle complexe intégrant les différents régimes de flux (Rivera et al., 2023). La méthode consiste à évaluer les paramètres séquentiellement avec des contraintes réduisant fortement le nombre de calculs effectués et donc le temps d'analyse. La méthode séquentielle inclut la détermination du régime de diffusion à partir du profil du contraste en fonction du temps d'exposition. Pour la configuration matérielle utilisée, le gain estimé en temps de calcul est un facteur d'environ 700 par rapport à l'ajustement non-linéaire pour des données MESI avec 15 temps d'exposition. Ces deux approches prometteuses restent cependant à implémenter et valider par d'autres groupes.

Pour l'analyse de données *in vivo*, l'approche CNN que nous avons implémentée montre une bonne convergence avec l'ajustement non-linéaire concernant le décours temporel de la réponse hémodynamique mais des valeurs sensiblement plus faibles des variations relatives. L'analyse *in vivo* a démontré la capacité du réseau à identifier de façon cohérente des variations de flux y compris pour des vaisseaux de taille différentes à celle des canaux utilisés dans la base de données d'entraînement. Les causes des différences observées entre CNN et régression non-linéaire devront être approfondies. Une piste est la différence entre les données d'entraînement et les données *in vivo*, avec en particulier une contribution variable, qui peut être importante, des diffuseurs statiques pour les données *in vivo* et qui n'a pas été intégrée dans le jeu de données d'entraînement. Une autre amélioration pourra être introduite pour les vaisseaux de faible diamètre pour lesquels le Res3D-Net montrait des performances modestes *in vitro*. L'écart entre la ligne de régression des résultats prédits par CNN et les valeurs attendues (débit de référence), sur le plus petit canal, pourrait être attribué au nombre plus faible de pixels occupé par les petits canaux par rapport aux grands canaux et à un taux de chevauchement relativement plus élevé entre les patches. Ceci se traduit par un nombre limité de patches d'entraînement pour un débit donné et un entraînement potentiellement insuffisant. Les travaux futurs devraient viser à résoudre ce problème en augmentant la taille de l'échantillon pour les canaux de plus petites dimensions et en adaptant la taille des patches à la dimension des canaux microfluidiques. En particulier, une étude spécifique sera conduite pour optimiser la taille des patches en tenant compte du compromis entre la précision de la quantification et la rapidité de l'analyse.

2.2 ATOUTS ET LIMITATIONS DE L'EMPLOI DE DONNÉES EXPÉRIMENTALES POUR L'ENTRAÎNEMENT DES RÉSEAUX DE NEURONES

Nous avons entraîné nos réseaux de neurones CNN à l'aide d'images de contraste speckle d'écoulements, acquies sur une puce microfluidique, obtenues expérimentalement avec le dispositif d'imagerie MESI à exposition synthétique. Par rapport à l'entraînement basé sur des images de contraste speckle simulées, la base de données d'entraînement expérimentale a l'avantage d'incorporer tous les paramètres instrumentaux et expérimentaux qui sont très difficiles à prendre en compte avec précision dans les simulations. Il a été démontré que les valeurs expérimentales de contraste speckle sont fortement affectées par de nombreux paramètres expérimentaux, dont certains sont difficiles à évaluer. Il s'agit notamment de l'échantillonnage spatial des grains de speckle au niveau du détecteur défini par le grandissement de la caméra, la dimension des pixels de la caméra et l'ouverture numérique de l'optique (Kirkpatrick et al., 2008), la longueur de cohérence de la source laser (Postnov et al., 2019), la polarisation de la source lumineuse et l'angle d'incidence (Vaz et al., 2016), l'intensité et la distribution de l'éclairage, la dynamique de la caméra et la profondeur de puits des pixels, le bruit de lecture de la caméra et le bruit d'obscurité (y compris le FPN) (Valdes et al., 2014; Chammas et al., 2022). Ici, l'utilisation de fantômes microfluidiques avec des débits contrôlés a permis de créer des images cibles avec des valeurs de débit précises pour l'entraînement des réseaux de neurones. Nous avons également pris soin d'entraîner les réseaux avec des images obtenues sur des canaux dont les dimensions et les débits sont représentatifs de la physiologie du cerveau de la souris, ce qui n'avait pas été fait dans les tentatives précédentes d'utilisation de l'apprentissage automatique pour l'analyse des images de speckle (Stebakov et al., 2021; Hao et al., 2023). Cependant, l'utilisation de données expérimentales présente également des limites par rapport aux données simulées. En pratique, les données MESI ne peuvent être acquies que pour un nombre fini de situations expérimentales, de sorte que tous les diamètres et débits possibles dans la gamme physiologique n'ont pas été utilisés. Cependant, l'analyse des données *in vivo* montre que le Res3D-Net a été capable de déduire des valeurs cohérentes pour les vaisseaux sanguins dont le diamètre et le débit exacts n'avaient pas été présentés au réseau lors de la phase d'entraînement, démontrant une certaine capacité de généralisation aux données *in vivo*. Nous émettons l'hypothèse que le réseau peut interpoler des données dans les paramètres de la gamme des données présentées lors de la phase d'apprentissage. D'autres travaux sont nécessaires pour explorer cette question et déterminer comment le réseau se comporterait pour des données dont les paramètres sont très éloignés de ceux utilisés pour l'entraînement, par exemple les capillaires les plus petits. L'utilisation de données simulées présente l'avantage intrinsèque de fournir une grande quantité de données pour une vaste gamme de paramètres. La question de savoir s'il est préférable d'utiliser des données expérimentales ou simulées pour former des réseaux CNN dans le contexte de l'imagerie speckle reste ouverte au débat. Cette piste est en cours d'exploration avec la construction d'un jeu de données simulées.

La quantification absolue du débit sanguin est hors portée avec les implémentations actuelles de l'imagerie speckle car la relation exacte entre le contraste speckle et le débit sanguin n'est pas encore établie (Duncan et al., 2008a; Kazmi et al., 2015b). Une hypothèse est que l'approche CNN « sans modèle » serait potentiellement capable de lever cette limitation intrinsèque. Pour atteindre la quantification absolue du débit sanguin, il est très probable que des données très variées, représentatives des nombreux types de régime de flux, devront être utilisées pour l'entraînement du réseau de neurones avec par exemple des images acquises dans diverses conditions réalistes en termes de diamètre, de profondeur et d'orientation des vaisseaux, ainsi que de propriétés optiques des tissus environnants voire des images expérimentales acquises *in vivo*. Ces différentes données pourront être utilisées séparément ou combinées pour entraîner le CNN dans le but d'obtenir une quantification absolue de la microcirculation. Dans ce contexte, nous avons entrepris de développer des fantômes microfluidiques plus complexes, intégrant l'absorption et la diffusion par les tissus entourant le vaisseau (Figure VI.1). Ces fantômes sont basés sur une approche ne nécessitant pas de photolithographie, ce qui permet (i) d'obtenir des canaux de section cylindrique, (ii) de contrôler la profondeur à laquelle se situe le canal, et, (iii) de fabriquer à faible coût et relativement facilement des fantômes avec différentes propriétés optiques de la matrice entourant le vaisseau. Le fantôme est créé à partir de fils métalliques à mémoire de forme de diamètre compris entre 50 et 250 μm . Ces fils ont la propriété de se tendre lorsqu'ils sont chauffés. Après que deux aiguilles creuses (pour la connectivité ultérieure) aient été positionnées de part et d'autre du fil, celui-ci est positionné en tension à une distance contrôlée (75, 200, 250 μm) du fond du réservoir destiné à recevoir le PDMS. Celui-ci est plus ou moins additionné en diffuseurs (TiO_2) ou absorbeurs (hémoglobine déshydratée remise en solution). Après cuisson du PDMS, le fil est simplement retiré, les aiguilles de connexion restant en place de part et d'autre du canal cylindrique créé.

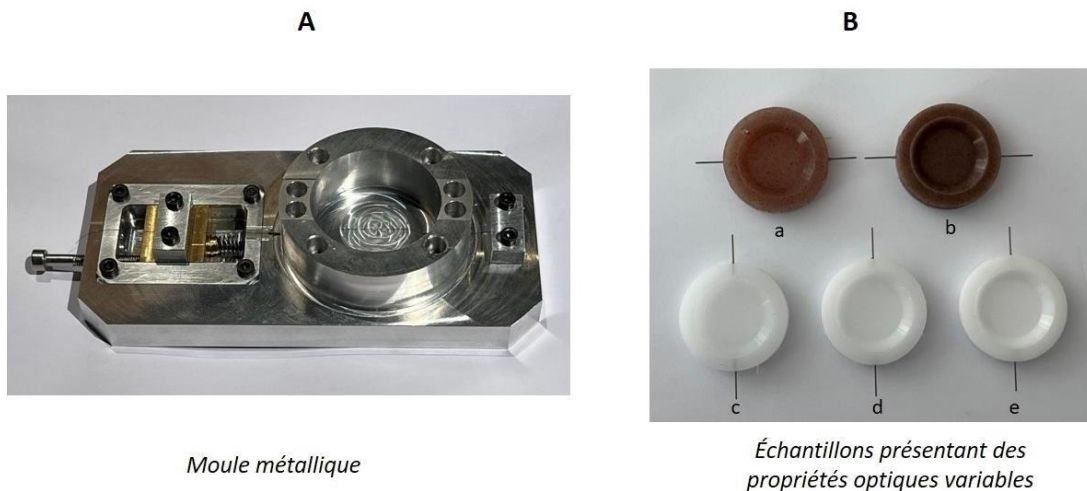


Figure VI.1. Développements de fantômes à propriétés d'absorption et de diffusion variables pour simuler le tissu biologique. (A) Moule métallique utilisé pour la cuisson des fantômes. (B) Les fantômes a et b correspondent à des concentrations en hémoglobine de 2.86 et 5.72 g/l respectivement pour évaluer l'influence de l'absorption; les fantômes c, d et e correspondent à des concentrations en oxyde de titane de 0.42, 0.85 et 1.7 g/l respectivement pour évaluer l'influence de la diffusion.

3 PHYSIOLOGIE

3.1 ALTÉRATION DE LA RÉPONSE HÉMODYNAMIQUE CHEZ LES SOURIS OBÈSES

Les maladies métaboliques, telle que l'obésité, augmentent le risque et l'impact des pathologies neurologiques comme les AVC, la démence et la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents sont partiellement compris. La comparaison de la réponse hémodynamique entre les souris obèses et les souris témoins, suite à l'activation du cortex somatosensoriel en tonneaux, a montré dans nos expériences que la variation du flux sanguin chez les souris obèses (12 semaines de régime) est significativement réduite par rapport aux souris témoins. Ces résultats suggèrent que le flux sanguin dans le cortex somatosensoriel en tonneaux chez les souris obèses n'est pas bien régulé. Des études antérieures, utilisant la stimulation somatosensorielle, ont montré les effets cérébrovasculaires délétères de l'obésité chez le rongeur en évaluant le débit sanguin local dans différentes zones corticales par sonde laser Doppler (Tarantini et al., 2018; Tucek et al., 2014) et notamment dans le bulbe olfactif par imagerie MESI (Soleimanzad et al., 2020). Toutefois, plusieurs interrogations subsistent malgré les nouvelles connaissances apportées par les études sur le dysfonctionnement neurovasculaire causé par l'obésité. Il existe de nombreuses raisons pour lesquelles la réponse hémodynamique peut être altérée. Tout d'abord, les mécanismes cellulaires et moléculaires contribuant au dysfonctionnement endothélial et à l'altération de l'hyperémie fonctionnelle devront être élucidés. L'obésité peut avoir des effets néfastes sur les messagers et les agents vasoactifs libérés par le réseau neuroglial, tels que le NO et la COX, et sur la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (Dorrance et al., 2014). De plus, l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses peut également être altérée, affectant l'activité myogénique et la régulation du diamètre vasculaire. Tous ces dysfonctionnements pourraient entraîner un dysfonctionnement du couplage neurovasculaire. Il est possible de tester ce couplage *in vitro* en utilisant des méthodes électrophysiologiques combinées à des dosages biochimiques, à l'amplification génétique et aux techniques d'immunohistochimie d'agents vasoactifs, comme notre collaborateur Bruno Cauli l'effectue dans son équipe à Sorbonne Université (Lacroix et al., 2015). Nous avons initié dans ce cadre et sur la base des résultats de la thèse, la construction d'un système d'imagerie MESI dans ce laboratoire. Ces différents outils *in vitro* pourraient aider à identifier les médiateurs vasculaires affectés dans le modèle d'obésité employé. Également, l'exploration du rôle potentiel de la neuro-inflammation dans le dysfonctionnement endothélial et l'altération de l'hyperémie fonctionnelle est d'une première nécessité. En effet, les personnes obèses présentent des taux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires provenant des adipocytes dans de nombreuses populations cellulaires cérébrales (Guillemot-Legrès et al., 2017). Une inflammation locale s'installe dans le cerveau due à la réactivité de la microglie et des astrocytes en réponse à la lipo- et gluco-toxicité des régimes cafétéria (Leffa et al., 2015). Évidemment, les processus inflammatoires dans le cerveau sont néfastes pour les vaisseaux sanguins (Pober et al., 2015). Cependant, tous les autres types de

cellules pourraient être exposés à la toxicité, notamment les neurones. Il a été démontré qu'une dérégulation de l'interaction dans l'unité neurovasculaire est à l'origine de la diminution du flux sanguin lors de l'activation somatosensorielle (Lecrux et al., 2011). Cela signifie qu'un ou plusieurs partenaires cellulaires permettant le couplage neurovasculaire dysfonctionnent au sein de l'unité neurovasculaire. L'enregistrement de l'activité du cortex somatosensoriel en tonneaux par électrophysiologie *in vivo* pourrait répondre partiellement à cette question.

3.2 APPROCHES POSSIBLES POUR LE RÉTABLISSEMENT DE L'HYPERÉMIE FONCTIONNELLE

Plusieurs approches sont possibles pour favoriser la protection du couplage neurovasculaire dans le cerveau contre la toxicité chez les patients souffrant de l'obésité. L'obésité étant plurifactorielle et très complexe à cerner, les possibilités de thérapie pour une amélioration de l'état métabolique du patient, surtout quand le DT2 s'est installé, sont également pluridimensionnelles et multidisciplinaires. La glycémie doit être absolument régulée et il existe plusieurs classes de médicaments qui permettent de maintenir et de diminuer la glycémie des patients obèses diabétiques. Parmi ces thérapies médicamenteuses, les agonistes des incrétines GLP-1 (« Glucagon-Like Peptide-1 ») et GIP (« Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide ») sont intéressants car ils sont à la fois neuro- et vasculo- protecteurs, notamment avec un effet sur la vascularisation cérébrale (Salcedo et al., 2012; Yang et al., 2022).

Dans le cas d'obésité morbide, des chirurgies bariatriques de différentes natures sur l'estomac et/ou l'intestin grêle, conduisent à une forte réduction du poids des patients, mais surtout à une baisse de leur glycémie. La chirurgie bariatrique peut aussi avoir des effets positifs sur la cognition et le métabolisme cérébral (Anwar et al., 2022). Néanmoins, il existe des données contradictoires dans la littérature concernant l'effet de la chirurgie bariatrique sur l'activité cérébrovasculaire, par exemple Tucker et al. ne montre pas d'amélioration de la vascularisation cérébrale après chirurgie (Tucker et al., 2020). Ce point pourrait être évalué sur des modèles animaux de chirurgie bariatrique associés à l'imagerie MESI.

À ces approches médicamenteuses et chirurgicales, il faut ajouter des approches nutritionnelles et d'activité physique. Les régimes alimentaires sont souvent utilisés comme traitement pour l'obésité. Par exemple, les régimes restrictifs visent à réduire la consommation de calories et à augmenter l'activité physique pour favoriser la perte de poids. Certains exemples de régimes populaires comprennent le régime méditerranéen, le régime cétogène et le régime pauvre en glucides entre autres. Ces régimes peuvent être efficaces pour perdre du poids, mais il est important de noter que la perte de poids à long terme dépend souvent de la capacité à maintenir des changements de mode de vie sains, plutôt que de suivre un régime à court terme. À ne pas oublier que cette solution n'exclue pas le fait que, au niveau anatomofonctionnel des vaisseaux sanguins, des traces de toxicité résiduelle pourraient demeurer dans le cerveau même après la perte de poids. Une autre solution possible, pour protéger le cerveau contre la toxicité induite par l'obésité, serait la supplémentation en AGPI ω -3. La plupart des études sur les rongeurs suggèrent que les ω -3 ont

un effet anti-obésité, notamment en réduisant la masse du tissu adipeux. Nous avons montré au cours de cette thèse qu'une supplémentation en DHA pour rétablir un équilibre $\frac{\omega-3}{\omega-6}$ de 1 (au lieu de 10 dans le régime hypercalorique hyperlipidique, comme c'est le cas dans l'alimentation hyperlipidique chez l'humain) avait un effet bénéfique sur l'activité vasculaire au niveau de la MCA enregistrée par imagerie MESI en exposition synthétique chez la souris obèse. Qu'en est-il chez l'humain ? En effet, des études sur la consommation d'huile de poisson chez les populations esquimaudes et japonaises montrent des effets bénéfiques de la supplémentation en $\omega-3$ (Albracht-Schulte et al., 2018). La combinaison d'une supplémentation en $\omega-3$ et d'une restriction calorique conduit à des résultats plus prometteurs en termes de perte de poids et d'améliorations des paramètres métaboliques (i.e. résistance à l'insuline, diminution du taux des triglycérides, etc.) comparés à la restriction calorique seule (Razny et al., 2015). Par ailleurs, la perte de poids rapide induite par un régime hypocalorique modifie la composition des acides gras, mais la supplémentation en $\omega-3$ pendant la perte de poids rapide peut prévenir des changements défavorables (Phinney et al., 1990). Certaines études suggèrent qu'une supplémentation en $\omega-3$ avant une intervention de perte de poids peut conduire à une perte de poids significativement plus importante (Munro et al., 2013). L'augmentation des concentrations des $\omega-3$ avant les interventions peut aussi aider à l'amélioration des dysfonctionnements métaboliques liés à l'obésité. L'activité physique est aussi une approche possible pour la protection du cerveau (Bherer et al., 2013). En effet, l'entraînement physique permettrait de maintenir une activation du réseau neuroglial renforçant ainsi le couplage neurovasculaire et assurant potentiellement une protection pour les vaisseaux sanguins. Des études ont examiné les effets des $\omega-3$ combinés à l'exercice et/ou à des interventions diététiques sur la perte de poids (Albracht-Schulte et al., 2018). À titre d'exemple, une étude montre une diminution du poids corporel avec l'ajout des $\omega-3$ à l'activité physique ou à une intervention diététique (DeFina et al., 2011). Effectivement, l'ajout des $\omega-3$ à l'entraînement aérobique et à l'entraînement de résistance sans intervention alimentaire entraîne une diminution de la masse grasse et une augmentation de la masse musculaire (Da Boit et al., 2017). Les effets combinés des $\omega-3$ et de l'exercice physique doivent faire l'objet de recherches plus approfondies vu que les différences d'intensité et de formes d'exercice physique utilisées empêchent des comparaisons valables entre les études. Concrètement, la combinaison de la restriction calorique et de la supplémentation en $\omega-3$ pourrait être la stratégie la plus efficace pour perdre du poids et améliorer la composition corporelle (Flachs et al., 2011).

Une fois que ce type d'approches thérapeutiques combinées aura été appliqué chez l'humain, il sera opportun de déterminer si le débit sanguin cérébral et la réponse hémodynamique suite à une activation physiologique (sensorielle par exemple) sont rétablis et si cela s'accompagne d'une amélioration cognitive.

AU-DELÀ DE L'IMAGERIE DU DÉBIT SANGUIN CÉRÉBRAL

Dans le cadre de cette thèse, nous proposons des améliorations instrumentales de la technique d'imagerie speckle MESI dans le but de faciliter son intégration en clinique. Particulièrement, les développements ont été focalisés sur l'imagerie du débit sanguin cérébral dans le cadre de l'étude des effets neurovasculaires de l'obésité. Néanmoins, l'imagerie speckle pourrait être employée dans d'autres domaines médicaux (pour revue sur les applications cliniques de l'imagerie speckle, Heeman et al., 2019). L'évaluation de la perfusion à l'aide de la S-LSCI a été évaluée en rhumatologie pour surveiller la réactivité vasculaire dynamique et le débit sanguin chez des patients atteints de sclérose en plaques (Della Rossa et al., 2013). L'arthrite est une maladie très répandue en rhumatologie. Elle est causée par une réaction inflammatoire affectant les articulations qui peut être caractérisée par une augmentation locale de la perfusion. Les différents stades de l'arthrite peuvent déjà être caractérisés avec succès par l'imagerie speckle dans des modèles animaux (Son et al., 2014). La détection chez l'humain, des premiers stades de l'arthrite pourrait permettre de retarder ou de prévenir d'autres dommages si la néo-angiogenèse caractéristique était quantifiée à l'aide de l'imagerie speckle. Au-delà de la rhumatologie, les brûlures sur des tissus superficiels tels que la peau ou le tissu musculaire constituent une cible adaptée pour l'imagerie speckle (Pape et al., 2001). L'état de la microcirculation sanguine est un indicateur de la capacité de cicatrisation et les modalités d'imagerie sans contact, en champ large, capables de visualiser le débit sanguin, peuvent être d'une grande aide pour le chirurgien des brûlures. En effet, le diagnostic incorrect des brûlures superficielles peut entraîner une morbidité liée à la septicémie (Kaiser et al., 2011). Par conséquent, il existe un besoin clinique d'une méthode objective et robuste pour l'évaluation de la microcirculation sanguine afin d'aider à déterminer si une intervention chirurgicale est nécessaire. L'imagerie de la microcirculation pourrait aussi être utile pour l'évaluation et le suivi de la microcirculation dans les suspicions et les cas avérés d'ulcères du pied diabétique (Mennes et al., 2019). Les diagnostics non invasifs traditionnels de l'ischémie critique dans les ulcères du pied diabétique ont des limites, car ils ne fournissent que des indications globales de l'ischémie au niveau macrovasculaire. L'imagerie speckle offre l'avantage d'une imagerie non-invasive et en champ large associée à une résolution spatiotemporelle adaptée pour l'étude de la microcirculation au niveau du pied diabétique. Pour résumer, l'imagerie de la microcirculation, et en particulier l'imagerie MESI, pourrait apporter des informations quantitatives d'intérêt pour diverses applications médicales. Au-delà des aspects instrumentaux et méthodologiques auxquels nous avons essayé de répondre en partie dans cette thèse, une limite importante reste la profondeur d'imagerie limitée. Des recherches supplémentaires et des essais prospectifs sont nécessaires pour surmonter ces limites, étant donné le potentiel important du MESI pour l'étude de la microcirculation sanguine comparé aux autres techniques d'imagerie existantes en milieu clinique.

BIBLIOGRAPHIE

- Albracht-Schulte, K. *et al.* (2018) ‘Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update’, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 58, pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.012>.
- Alzubaidi, L. *et al.* (2021) ‘Review of deep learning: concepts, CNN architectures, challenges, applications, future directions’, *Journal of Big Data*, 8(1), p. 53. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40537-021-00444-8>.
- Amidon, R.F. *et al.* (2021) ‘Utilization of Cerebral Blood Flow Study With Computed Tomography for Subdural Hematoma Management’, *Cureus* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.16314>.
- Anstey, K.J. *et al.* (2011) ‘Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies: BMI and risk of dementia’, *Obesity Reviews*, 12(5), pp. e426–e437. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2010.00825.x>.
- Anwar, N. *et al.* (2022) ‘Cognition and brain oxygen metabolism improves after bariatric surgery-induced weight loss: A pilot study’, *Frontiers in Endocrinology*, 13, p. 954127. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.954127>.
- Bahadori, S., Immins, T. and Wainwright, T.W. (2017) ‘A Novel Approach to Overcome Movement Artifact When Using a Laser Speckle Contrast Imaging System for Alternating Speeds of Blood Microcirculation’, *Journal of Visualized Experiments*, (126), p. 56415. Available at: <https://doi.org/10.3791/56415>.
- Bandyopadhyay, R. *et al.* (2005) ‘Speckle-visibility spectroscopy: A tool to study time-varying dynamics’. Available at: <https://doi.org/10.48550/ARXIV.COND-MAT/0506081>.
- Barzegar-Fallah, A. *et al.* (2022) ‘Harnessing Ultrasound for Targeting Drug Delivery to the Brain and Breaching the Blood–Brain Tumour Barrier’, *Pharmaceutics*, 14(10), p. 2231. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102231>.
- Basu, S. *et al.* (2011) ‘Fundamentals of PET and PET/CT imaging: Fundamentals of PET and PET/CT’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1228(1), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06077.x>.
- BEH (2016) ‘Prévalence du surpoids, de l’obésité et des facteurs de risque cardio-métaboliques dans la cohorte constances’.
- Bélanger, M., Allaman, I. and Magistretti, P.J. (2011) ‘Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation’, *Cell Metabolism*, 14(6), pp. 724–738. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>.
- Bertolo, A. *et al.* (2021) ‘Whole-Brain 3D Activation and Functional Connectivity Mapping in Mice using Transcranial Functional Ultrasound Imaging’, *Journal of Visualized Experiments*, (168), p. 62267. Available at: <https://doi.org/10.3791/62267>.
- Bherer, L., Erickson, K.I. and Liu-Ambrose, T. (2013) ‘A Review of the Effects of Physical Activity and Exercise on Cognitive and Brain Functions in Older Adults’, *Journal of Aging Research*, 2013, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/657508>.
- Blass, J.P., Sheu, R.K.-F. and Gibson, G.E. (2000) ‘Inherent Abnormalities in Energy Metabolism in Alzheimer Disease: Interaction with Cerebrovascular Compromise’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 903(1 VASCULAR FACT), pp. 204–221. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06370.x>.
- Boas, D.A. and Dunn, A.K. (2010) ‘Laser speckle contrast imaging in biomedical optics’, *Journal of Biomedical Optics*, 15(1), p. 011109. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.3285504>.

- Boas, D.A. and Yodh, A.G. (1997) ‘Spatially varying dynamical properties of turbid media probed with diffusing temporal light correlation’, *Journal of the Optical Society of America A*, 14(1), p. 192. Available at: <https://doi.org/10.1364/JOSAA.14.000192>.
- Bonner, R. and Nossal, R. (1981) ‘Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue’, *Applied Optics*, 20(12), p. 2097. Available at: <https://doi.org/10.1364/AO.20.002097>.
- Bouchard, M.B. *et al.* (2009) ‘Ultra-fast multispectral optical imaging of cortical oxygenation, blood flow, and intracellular calcium dynamics’, *Optics express*, 17(18), pp. 15670–15678.
- Briers, D. *et al.* (2013) ‘Laser speckle contrast imaging: theoretical and practical limitations’, *Journal of Biomedical Optics*, 18(6), p. 066018. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.6.066018>.
- Briers, J.D. (1996) ‘Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow’, *Journal of Biomedical Optics*, 1(2), p. 174. Available at: <https://doi.org/10.1117/12.231359>.
- Camici, P.G. and Crea, F. (2007) ‘Coronary Microvascular Dysfunction’, *New England Journal of Medicine*, 356(8), pp. 830–840. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra061889>.
- Cardim, D. *et al.* (2019) ‘Transcranial Doppler Non-invasive Assessment of Intracranial Pressure, Autoregulation of Cerebral Blood Flow and Critical Closing Pressure during Orthotopic Liver Transplant’, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 45(6), pp. 1435–1445. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.02.003>.
- Carey, Joseph, Ed. (1990) *Brain Facts: A Primer on the Brain and Nervous System*. Society for Neuroscience, Washington, DC.
- Cauli, B. and Hamel, E. (2018) ‘Brain Perfusion and Astrocytes’, *Trends in Neurosciences*, 41(7), pp. 409–413. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.04.010>.
- Chaigneau, E. *et al.* (2003) ‘Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), pp. 13081–13086. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2133652100>.
- Chammas, M. *et al.* (2021) ‘Comparison of synthetic exposure and sequential exposure for multiple exposure speckle imaging of blood flow’, in *European Conferences on Biomedical Optics 2021 (ECBO) (2021), paper EW4A.18. European Conference on Biomedical Optics*, Optica Publishing Group, p. EW4A.18. Available at: <https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=ECBO-2021-EW4A.18> (Accessed: 13 June 2023).
- Chammas, M. *et al.* (2022) ‘Unwanted movement bias evaluation for multiple exposure speckle imaging of blood flow using the synthetic exposure approach’, in Z. Zalevsky, V.V. Tuchin, and W.C. Blondel (eds) *Tissue Optics and Photonics II. Tissue Optics and Photonics II*, Strasbourg, France: SPIE, p. 23. Available at: <https://doi.org/10.1117/12.2620674>.
- Chammas, M. and Pain, F. (2022) ‘Synthetic exposure with a CMOS camera for multiple exposure speckle imaging of blood flow’, *Scientific Reports*, 12(1), p. 4708. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08647-6>.
- Chan, V. and Perlas, A. (2011) ‘Basics of Ultrasound Imaging’, in S.N. Narouze (ed.) *Atlas of Ultrasound-Guided Procedures in Interventional Pain Management*. New York, NY: Springer New York, pp. 13–19. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1681-5_2.
- Cheng, H. *et al.* (2003) ‘Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution’, *Journal of Biomedical Optics*, 8(3), pp. 559–564. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.1578089>.
- Chizari, A. *et al.* (2021) ‘Handheld versus mounted laser speckle contrast perfusion imaging demonstrated in psoriasis lesions’, *Scientific Reports*, 11(1), p. 16646. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96218-6>.

- Collins, S. *et al.* (2004) ‘Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics’, *Physiology & Behavior*, 81(2), pp. 243–248. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.006>.
- Coucha, M. *et al.* (2018) ‘Impact of Metabolic Diseases on Cerebral Circulation: Structural and Functional Consequences’, in R. Terjung (ed.) *Comprehensive Physiology*. 1st edn. Wiley, pp. 773–799. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c170019>.
- Couture, O. *et al.* (2018) ‘Ultrasound Localization Microscopy and Super-Resolution: A State of the Art’, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 65(8), pp. 1304–1320. Available at: <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2018.2850811>.
- Crisp, R. (2020) ‘Digital camera design, part 5: Basic noise considerations for CMOS image sensors’, *EDN*, 9 December. Available at: <https://www.edn.com/digital-camera-design-part-5-basic-noise-considerations-for-cmos-image-sensors/> (Accessed: 30 June 2023).
- Da Boit, M. *et al.* (2017) ‘Sex differences in the effect of fish-oil supplementation on the adaptive response to resistance exercise training in older people: a randomized controlled trial’, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(1), pp. 151–158. Available at: <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.140780>.
- DAMAE MEDICAL (no date). Available at: <https://damae-medical.com/> (Accessed: 23 May 2023).
- D’Andrea, A. *et al.* (2016) ‘Transcranial Doppler ultrasonography: From methodology to major clinical applications’, *World Journal of Cardiology*, 8(7), p. 383. Available at: <https://doi.org/10.4330/wjc.v8.i7.383>.
- Davidson, T.L. *et al.* (2012) ‘The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood–brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats’, *Physiology & Behavior*, 107(1), pp. 26–33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.05.015>.
- Davidson, T.L. *et al.* (2013) ‘Inter-relationships among diet, obesity and hippocampal-dependent cognitive function’, *Neuroscience*, 253, pp. 110–122. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.044>.
- DeFina, L.F. *et al.* (2011) ‘Effects of omega-3 supplementation in combination with diet and exercise on weight loss and body composition’, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(2), pp. 455–462. Available at: <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.002741>.
- Della Rossa, A. *et al.* (2013) ‘Alteration of microcirculation is a hallmark of very early systemic sclerosis patients: a laser speckle contrast analysis’, *Clinical and Experimental Rheumatology*, 31(2 Suppl 76), pp. 109–114.
- Demeestere, J. *et al.* (2020) ‘Review of Perfusion Imaging in Acute Ischemic Stroke: From Time to Tissue’, *Stroke*, 51(3), pp. 1017–1024. Available at: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.028337>.
- Demene, C. *et al.* (2015) ‘Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity’, *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 34(11), pp. 2271–2285. Available at: <https://doi.org/10.1109/TMI.2015.2428634>.
- Demene, C. *et al.* (2017) ‘Functional ultrasound imaging of brain activity in human newborns’, *Science Translational Medicine*, 9(411), p. eaah6756. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6756>.
- Demené, C. *et al.* (2021) ‘Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients’, *Nature Biomedical Engineering*, 5(3), pp. 219–228. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00697-x>.
- Den Uil, C.A. *et al.* (2008) ‘The Microcirculation in Health and Critical Disease’, *Progress in Cardiovascular Diseases*, 51(2), pp. 161–170. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2008.07.002>.
- Deng, J. *et al.* (2009) ‘ImageNet: A large-scale hierarchical image database’, in *2009 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. 2009 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshops (CVPR Workshops)*, Miami, FL: IEEE, pp. 248–255. Available at: <https://doi.org/10.1109/CVPR.2009.5206848>.

- ‘DermaInspect’ (2016) *Multiphoton Tomography*, 4 October. Available at: <https://mpt-tomography.de/dermaininspect/> (Accessed: 23 May 2023).
- Devor, A. *et al.* (2012) ‘Frontiers in optical imaging of cerebral blood flow and metabolism’, *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(7), pp. 1259–1276. Available at: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.195>.
- Dirnagl, U. *et al.* (1989) ‘Continuous Measurement of Cerebral Cortical Blood Flow by Laser—Doppler Flowmetry in a Rat Stroke Model’, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 9(5), pp. 589–596. Available at: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1989.84>.
- Donner, G.T. *et al.* (2003) ‘Hyperglycemia affects flicker-induced vasodilation in the retina of healthy subjects’, *Vision Research*, 43(13), pp. 1495–1500. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(03\)00170-6](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(03)00170-6).
- Dorrance, A., Matin, N. and Pires, P. (2014) ‘The Effects of Obesity on the Cerebral Vasculature’, *Current Vascular Pharmacology*, 12(3), pp. 462–472. Available at: <https://doi.org/10.2174/1570161112666140423222411>.
- Dragojević, T. *et al.* (2017) ‘High-density speckle contrast optical tomography (SCOT) for three dimensional tomographic imaging of the small animal brain’, *NeuroImage*, 153, pp. 283–292. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.04.003>.
- Dragojević, T. *et al.* (2018) ‘Compact, multi-exposure speckle contrast optical spectroscopy (SCOS) device for measuring deep tissue blood flow’, *Biomedical Optics Express*, 9(1), pp. 322–334. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.9.000322>.
- Draijer, M.J. *et al.* (2010) ‘Relation between the contrast in time integrated dynamic speckle patterns and the power spectral density of their temporal intensity fluctuations’, *Optics Express*, 18(21), pp. 21883–21891.
- Drake, C. and Iadecola, C. (2007) ‘The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow’, *Brain and Language*, 102(2), pp. 141–152. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2006.08.002>.
- Drew, P.J., Shih, A.Y. and Kleinfeld, D. (2011) ‘Fluctuating and sensory-induced vasodynamics in rodent cortex extend arteriole capacity’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20), pp. 8473–8478. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1100428108>.
- Duarte, J.V. *et al.* (2015) ‘Early Disrupted Neurovascular Coupling and Changed Event Level Hemodynamic Response Function in Type 2 Diabetes: An fMRI Study’, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(10), pp. 1671–1680. Available at: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.106>.
- Duclaux, J. (1940) ‘Le mouvement brownien et la formule d’Einstein’, *Journal de Physique et le Radium*, 1(3), pp. 81–84. Available at: <https://doi.org/10.1051/jphysrad:019400010308100>.
- Duncan, D.D. and Kirkpatrick, S.J. (2008a) ‘Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool?’, *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, 25(8), pp. 2088–2094.
- Duncan, D.D. and Kirkpatrick, S.J. (2008b) ‘Spatio-temporal algorithms for processing laser speckle imaging data’, in S.J. Kirkpatrick and R.K. Wang (eds). *Biomedical Optics (BiOS) 2008*, San Jose, CA, p. 685802. Available at: <https://doi.org/10.1117/12.760514>.
- Dunn, A.K. *et al.* (2001) ‘Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle’, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(3), pp. 195–201. Available at: <https://doi.org/10.1097/00004647-200103000-00002>.
- Dunn, A.K. *et al.* (2005) ‘Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex’, *NeuroImage*, 27(2), pp. 279–290. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.04.024>.
- Dunn, J.F. *et al.* (2011) ‘A transmissive laser speckle imaging technique for measuring deep tissue blood flow: An example application in finger joints: LASER SPECKLE IMAGING OF BLOOD FLOW IN FINGER JOINTS’, *Lasers in Surgery and Medicine*, 43(1), pp. 21–28. Available at: <https://doi.org/10.1002/lsm.21018>.

- Durduran, T. *et al.* (2004) ‘Spatiotemporal Quantification of Cerebral Blood Flow during Functional Activation in Rat Somatosensory Cortex using Laser-Speckle Flowmetry’, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 24(5), pp. 518–525. Available at: <https://doi.org/10.1097/00004647-200405000-00005>.
- Eriksson, S. *et al.* (2014) ‘Laser speckle contrast imaging for intraoperative assessment of liver microcirculation: a clinical pilot study’, *Medical Devices: Evidence and Research*, p. 257. Available at: <https://doi.org/10.2147/MDER.S63393>.
- Errico, C. *et al.* (2015) ‘Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging’, *Nature*, 527(7579), pp. 499–502. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature16066>.
- Farraro, R., Fathi, O. and Choi, B. (2016) ‘Handheld, point-of-care laser speckle imaging’, *Journal of Biomedical Optics*, 21(9), p. 094001. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.9.094001>.
- Fercher, A.F. and Briers, J.D. (1981) ‘Flow visualization by means of single-exposure speckle photography’, *Optics Communications*, 37(5), pp. 326–330. Available at: [https://doi.org/10.1016/0030-4018\(81\)90428-4](https://doi.org/10.1016/0030-4018(81)90428-4).
- Flachs, P. *et al.* (2011) ‘Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids’, *Diabetologia*, 54(10), pp. 2626–2638. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2233-2>.
- Forrester, K.R. *et al.* (2002) ‘Comparison of laser speckle and laser Doppler perfusion imaging: Measurement in human skin and rabbit articular tissue’, *Medical & Biological Engineering & Computing*, 40(6), pp. 687–697. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02345307>.
- Fox, P.T. and Raichle, M.E. (1986) ‘Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(4), pp. 1140–1144. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.83.4.1140>.
- Fredriksson, I. *et al.* (2019) ‘Machine learning in multiexposure laser speckle contrast imaging can replace conventional laser Doppler flowmetry’, *Journal of Biomedical Optics*, 24(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.24.1.016001>.
- Fujimoto, J.G. *et al.* (2000) ‘Optical Coherence Tomography: An Emerging Technology for Biomedical Imaging and Optical Biopsy’, *Neoplasia*, 2(1–2), pp. 9–25. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900071>.
- Fujimoto, J.G. (2003) ‘Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging’, *Nature Biotechnology*, 21(11), pp. 1361–1367. Available at: <https://doi.org/10.1038/nbt892>.
- Giannoni, L., Lange, F. and Tachtsidis, I. (2018) ‘Hyperspectral imaging solutions for brain tissue metabolic and hemodynamic monitoring: past, current and future developments’, *Journal of Optics (2010)*, 20(4), p. 044009. Available at: <https://doi.org/10.1088/2040-8986/aab3a6>.
- Giaume, C. *et al.* (2009) ‘The Barrel Cortex as a Model to Study Dynamic Neuroglial Interaction’, *The Neuroscientist*, 15(4), pp. 351–366. Available at: <https://doi.org/10.1177/1073858409336092>.
- Gilletti, A. and Muthuswamy, J. (2006) ‘Brain micromotion around implants in the rodent somatosensory cortex’, *Journal of Neural Engineering*, 3(3), pp. 189–195. Available at: <https://doi.org/10.1088/1741-2560/3/3/001>.
- Goodman, J.W. (1975) ‘Statistical Properties of Laser Speckle Patterns’, in *Laser Speckle and Related Phenomena*. Springer, Berlin, Heidelberg (Topics in Applied Physics), pp. 9–75. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-662-43205-1_2.
- Goossens, G.H. (2017a) ‘The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function’, *Obesity Facts*, 10(3), pp. 207–215. Available at: <https://doi.org/10.1159/000471488>.
- Goossens, G.H. (2017b) ‘The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function’, *Obesity Facts*, 10(3), pp. 207–215. Available at: <https://doi.org/10.1159/000471488>.

- Greenberg, A.S. and Obin, M.S. (2006a) ‘Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism’, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), pp. 461S-465S. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.461S>.
- Greenberg, A.S. and Obin, M.S. (2006b) ‘Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism’, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), pp. 461S-465S. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.461S>.
- Guerraty, M. *et al.* (2021) ‘Advances in translational imaging of the microcirculation’, *Microcirculation*, 28(3). Available at: <https://doi.org/10.1111/micc.12683>.
- Guillemot-Legriss, O. and Muccioli, G.G. (2017) ‘Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus’, *Trends in Neurosciences*, 40(4), pp. 237–253. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.02.005>.
- Gustafson, D. *et al.* (2003) ‘An 18-Year Follow-up of Overweight and Risk of Alzheimer Disease’, *Archives of Internal Medicine*, 163(13), p. 1524. Available at: <https://doi.org/10.1001/archinte.163.13.1524>.
- Hady, M.F.A. and Schwenker, F. (2013) ‘Semi-supervised Learning’, in M. Bianchini, M. Maggini, and L.C. Jain (eds) *Handbook on Neural Information Processing*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Intelligent Systems Reference Library), pp. 215–239. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-642-36657-4_7.
- Hao, X. *et al.* (2023) ‘A quantitative laser speckle-based velocity prediction approach using machine learning’, *Optics and Lasers in Engineering*, 166, p. 107587. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2023.107587>.
- Hata, A. *et al.* (2018) ‘Effect of Matrix Size on the Image Quality of Ultra-high-resolution CT of the Lung’, *Academic Radiology*, 25(7), pp. 869–876. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.acra.2017.11.017>.
- He, K. *et al.* (2016) ‘Identity Mappings in Deep Residual Networks’, in B. Leibe *et al.* (eds) *Computer Vision – ECCV 2016*. Cham: Springer International Publishing (Lecture Notes in Computer Science), pp. 630–645. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-46493-0_38.
- Hecht, N. *et al.* (2009) ‘Intraoperative monitoring of cerebral blood flow by laser speckle contrast analysis’, *Neurosurgical Focus*, 27(4), p. E11. Available at: <https://doi.org/10.3171/2009.8.FOCUS09148>.
- Hecht, N. *et al.* (2016) ‘Infarct prediction by intraoperative laser speckle imaging in patients with malignant hemispheric stroke’, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(6), pp. 1022–1032. Available at: <https://doi.org/10.1177/0271678X15612487>.
- Heeman, W. *et al.* (2019) ‘Clinical applications of laser speckle contrast imaging: a review’, *Journal of Biomedical Optics*, 24(08), p. 1. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.24.8.080901>.
- Helmchen, F. and Denk, W. (2005) ‘Deep tissue two-photon microscopy’, *Nature Methods*, 2(12), pp. 932–940. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth818>.
- Huang, D. *et al.* (1991) ‘Optical coherence tomography’, *Science (New York, N.Y.)*, 254(5035), pp. 1178–1181. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1957169>.
- Huang, J.-Y. *et al.* (2014) ‘*In Vivo* Two-photon Fluorescence Microscopy Reveals Disturbed Cerebral Capillary Blood Flow and Increased Susceptibility to Ischemic Insults in Diabetic Mice’, *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 20(9), pp. 816–822. Available at: <https://doi.org/10.1111/cns.12268>.
- Hultman, M., Fredriksson, I., Larsson, M., Alvandpour, A., *et al.* (2018a) ‘A 15.6 frames per second 1-megapixel multiple exposure laser speckle contrast imaging setup’, *Journal of Biophotonics*, 11(2). Available at: <https://doi.org/10.1002/jbio.201700069>.
- Hultman, M., Fredriksson, I., Larsson, M., Alvandpour, A., *et al.* (2018b) ‘A 15.6 frames per second 1-megapixel multiple exposure laser speckle contrast imaging setup’, *Journal of Biophotonics*, 11(2), p. e201700069. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbio.201700069>.

- Hultman, M., Fredriksson, I., Larsson, M. and Strömberg, T. (2018) 'Evaluation of a high framerate multi-exposure laser speckle contrast imaging setup', in K. Goda and K.K. Tsia (eds) *High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy III: Toward Big Data Instrumentation and Management*. *High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy III: Toward Big Data Instrumentation and Management*, San Francisco, United States: SPIE, p. 44. Available at: <https://doi.org/10.1117/12.2286248>.
- Hultman, M. *et al.* (2023) 'Flowmotion imaging analysis of spatiotemporal variations in skin microcirculatory perfusion', *Microvascular Research*, 146, p. 104456. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2022.104456>.
- Humeau-Heurtier, A., Abraham, P. and Mahe, G. (2013) 'Linguistic Analysis of Laser Speckle Contrast Images Recorded at Rest and During Biological Zero: Comparison With Laser Doppler Flowmetry Data', *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 32(12), pp. 2311–2321. Available at: <https://doi.org/10.1109/TMI.2013.2281620>.
- Imbault, M. *et al.* (2017) 'Intraoperative Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity', *Scientific Reports*, 7(1), p. 7304. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06474-8>.
- Jones, P.B. *et al.* (2008) 'Simultaneous multispectral reflectance imaging and laser speckle flowmetry of cerebral blood flow and oxygen metabolism in focal cerebral ischemia', *Journal of Biomedical Optics*, 13(4), p. 044007. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.2950312>.
- Kaiser, M. *et al.* (2011) 'Noninvasive assessment of burn wound severity using optical technology: A review of current and future modalities', *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 37(3), pp. 377–386. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2010.11.012>.
- Katti, G., Ara, S. and Shireen, A. (2011) 'Magnetic Resonance Imaging (MRI) – A Review', *International Journal of Dental Clinics* [Preprint]. Available at: [https://www.semanticscholar.org/paper/Magnetic-Resonance-Imaging-\(MRI\)-%E2%80%93-A-Review-Katti-Ara/7ab0b8b8d7eb7493803a9c32ea45c9e7745beba8](https://www.semanticscholar.org/paper/Magnetic-Resonance-Imaging-(MRI)-%E2%80%93-A-Review-Katti-Ara/7ab0b8b8d7eb7493803a9c32ea45c9e7745beba8) (Accessed: 22 May 2023).
- Kawamura, H. *et al.* (2003) 'ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina', *The Journal of Physiology*, 551(3), pp. 787–799. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.047977>.
- Kazmi, S.M.S., Richards, L.M., *et al.* (2015) 'Expanding applications, accuracy, and interpretation of laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(7), pp. 1076–1084. Available at: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.84>.
- Kazmi, S.M.S., Faraji, E., *et al.* (2015a) 'Flux or speed? Examining speckle contrast imaging of vascular flows', *Biomedical Optics Express*, 6(7), p. 2588. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.6.002588>.
- Kazmi, S.M.S., Faraji, E., *et al.* (2015b) 'Flux or speed? Examining speckle contrast imaging of vascular flows', *Biomedical Optics Express*, 6(7), pp. 2588–2608. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.6.002588>.
- Kazmi, S.M.S., Balial, S. and Dunn, A.K. (2014) 'Optimization of camera exposure durations for multi-exposure speckle imaging of the microcirculation', *Biomedical Optics Express*, 5(7), p. 2157. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.5.002157>.
- Kelly-Cobbs, A.I. *et al.* (2012) 'Cerebral Myogenic Reactivity and Blood Flow in Type 2 Diabetic Rats: Role of Peroxynitrite in Hypoxia-Mediated Loss of Myogenic Tone', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(2), pp. 407–415. Available at: <https://doi.org/10.1124/jpet.111.191296>.
- Khan, R. *et al.* (2011) 'Measurements and modeling of transient blood flow perturbations induced by brief somatosensory stimulation', *The Open Neuroimaging Journal*, 5, pp. 96–104. Available at: <https://doi.org/10.2174/1874440001105010096>.
- Kilic, E. *et al.* (2004) 'Melatonin reduces disseminate neuronal death after mild focal ischemia in mice via inhibition of caspase-3 and is suitable as an add-on treatment to tissue-plasminogen activator: Melatonin

- and tissue plasminogen activator in stroke', *Journal of Pineal Research*, 36(3), pp. 171–176. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1600-079X.2003.00115.x>.
- Kirkpatrick, S.J., Duncan, D.D. and Wells-Gray, E.M. (2008) 'Detrimental effects of speckle-pixel size matching in laser speckle contrast imaging', *Optics Letters*, 33(24), p. 2886. Available at: <https://doi.org/10.1364/OL.33.002886>.
- Klein, R., Beanlands, R.S.B. and deKemp, R.A. (2010) 'Quantification of myocardial blood flow and flow reserve: Technical aspects', *Journal of Nuclear Cardiology*, 17(4), pp. 555–570. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12350-010-9256-9>.
- Klijn, E. *et al.* (2013) 'Laser speckle imaging identification of increases in cortical microcirculatory blood flow induced by motor activity during awake craniotomy: Clinical article', *Journal of Neurosurgery*, 118(2), pp. 280–286. Available at: <https://doi.org/10.3171/2012.10.JNS1219>.
- Knecht, S. *et al.* (1998) 'Noninvasive Determination of Language Lateralization by Functional Transcranial Doppler Sonography: A Comparison With the Wada Test', *Stroke*, 29(1), pp. 82–86. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.STR.29.1.82>.
- Kusza, K. and Siemionow, M. (2011) 'Is the knowledge on tissue microcirculation important for microsurgery?', *Microsurgery*, 31(7), pp. 572–579. Available at: <https://doi.org/10.1002/micr.20927>.
- Lacroix, A. *et al.* (2015) 'COX-2-Derived Prostaglandin E2 Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the Rodent Cerebral Cortex', *Journal of Neuroscience*, 35(34), pp. 11791–11810. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0651-15.2015>.
- Láíns, I. *et al.* (2021) 'Retinal applications of swept source optical coherence tomography (OCT) and optical coherence tomography angiography (OCTA)', *Progress in Retinal and Eye Research*, 84, p. 100951. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100951>.
- LASCA, Perimed (no date) 'Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA)', *Perimed*. Available at: <https://www.perimed-instruments.com/content/laser-speckle-contrast-analysis-lasca/> (Accessed: 23 May 2023).
- 'Laser Speckle Contrast Analysis a.k.a. Laser Speckle Contrast Imaging' (2021) *Perimed*, 30 June. Available at: <https://www.perimed-instruments.com/content/laser-speckle-contrast-analysis-lasca/> (Accessed: 30 June 2021).
- Lau, W., Shanbao Tong and Thakor, N.V. (2005) 'Spatiotemporal characteristics of low-frequency functional activation measured by laser speckle imaging', *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, 13(2), pp. 179–185. Available at: <https://doi.org/10.1109/TNSRE.2005.847371>.
- Lauritzen, M. (2001) 'Relationship of Spikes, Synaptic Activity, and Local Changes of Cerebral Blood Flow', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(12), pp. 1367–1383. Available at: <https://doi.org/10.1097/00004647-200112000-00001>.
- LDF, Moor Instruments (no date) *Laser Doppler Blood Flow Monitor | moorVMS-LDF*, *Moor Instruments*. Available at: <https://www.moor.co.uk/products/monitoring/laser-doppler-monitor/> (Accessed: 20 June 2023).
- LDPM, Perimed (no date) 'Laser Doppler Perfusion Monitoring (LDPM)', *Perimed*. Available at: <https://www.perimed-instruments.com/content/laser-doppler-perfusion-monitoring-ldpm/> (Accessed: 23 May 2023).
- Lecrux, C. and Hamel, E. (2011) 'The neurovascular unit in brain function and disease: The neurovascular unit function', *Acta Physiologica*, 203(1), pp. 47–59. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02256.x>.
- Leffa, D.D. *et al.* (2015) 'Effects of palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice', *Metabolic Brain Disease*, 30(4), pp. 1073–1082. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11011-015-9682-0>.

- Lertsakdadet, B. *et al.* (2019) ‘Handheld motion stabilized laser speckle imaging’, *Biomedical Optics Express*, 10(10), pp. 5149–5158. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.10.005149>.
- Li, P. *et al.* (2013) ‘Methods on Improving Sampling Depth of Laser Speckle Contrast Imaging of Blood Flow’, in *Asia Communications and Photonics Conference 2013. Asia Communications and Photonics Conference*, Beijing: OSA, p. AF1J.4. Available at: <https://doi.org/10.1364/ACPC.2013.AF1J.4>.
- Li, W. *et al.* (2013) ‘Early effects of high-fat diet on neurovascular function and focal ischemic brain injury’, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(11), pp. R1001–R1008. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00523.2012>.
- Li, Y. *et al.* (2018) ‘Aging-associated changes in cerebral vasculature and blood flow as determined by quantitative optical coherence tomography angiography’, *Neurobiology of Aging*, 70, pp. 148–159. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.017>.
- Liu, C. *et al.* (2021) ‘Choosing a model for laser speckle contrast imaging’, *Biomedical Optics Express*, 12(6), p. 3571. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.426521>.
- Liu, X. *et al.* (2021) ‘Motion correction of laser speckle imaging of blood flow by simultaneous imaging of tissue structure and non-rigid registration’, *Optics and Lasers in Engineering*, 140, p. 106526. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2020.106526>.
- Liu, Y.Z. *et al.* (2022) ‘Utility and usability of laser speckle contrast imaging (LSCI) for displaying real-time tissue perfusion/blood flow in robot-assisted surgery (RAS): comparison to indocyanine green (ICG) and use in laparoscopic surgery’, *Surgical Endoscopy* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00464-022-09590-3>.
- Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R. and Jaswal, J.S. (2010) ‘Targeting Intermediary Metabolism in the Hypothalamus as a Mechanism to Regulate Appetite’, *Pharmacological Reviews*, 62(2), pp. 237–264. Available at: <https://doi.org/10.1124/pr.109.002428>.
- LSCI, Moor Instruments (2021) *Laser Speckle Contrast Imager | moorFLPI-2, Moor Instruments*. Available at: <https://www.moor.co.uk/products/imaging/laser-speckle-contrast-imager/> (Accessed: 30 June 2021).
- Ma, J. *et al.* (1996) ‘Regional cerebral blood flow response to vibrissal stimulation in mice lacking type I NOS gene expression’, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 270(3), pp. H1085–H1090. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.270.3.H1085>.
- Mace, E. *et al.* (2013) ‘Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles’, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 60(3), pp. 492–506. Available at: <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2013.2592>.
- Maggio, C.A. and Pi-Sunyer, F.X. (2003) ‘Obesity and type 2 diabetes’, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 32(4), pp. 805–822. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(03\)00071-9](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(03)00071-9).
- Mahesh, M. and Cody, D.D. (2007) ‘Physics of Cardiac Imaging with Multiple-Row Detector CT’, *RadioGraphics*, 27(5), pp. 1495–1509. Available at: <https://doi.org/10.1148/rg.275075045>.
- Makwe, A. and Rathore, A.S. (2021) ‘An Empirical Study of Neural Network Hyperparameters’, in V. Bhateja *et al.* (eds) *Evolution in Computational Intelligence*. Singapore: Springer Singapore (Advances in Intelligent Systems and Computing), pp. 371–383. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-15-5788-0_36.
- Mazhar, A. *et al.* (2011) ‘Laser speckle imaging in the spatial frequency domain’, *Biomedical optics express*, 2(6), pp. 1553–1563. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.2.001553>.
- McCulloch, W.S. and Pitts, W. (1943) ‘A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity’, *The Bulletin of Mathematical Biophysics*, 5(4), pp. 115–133. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02478259>.

- Mennes, O.A. *et al.* (2019) ‘Assessment of microcirculation in the diabetic foot with laser speckle contrast imaging’, *Physiological Measurement*, 40(6), p. 065002. Available at: <https://doi.org/10.1088/1361-6579/ab2058>.
- Micheels, J., Aisbjorn, B. and Sorensen, B. (1984) ‘Laser doppler flowmetry. A new non-invasive measurement of microcirculation in intensive care?’, *Resuscitation*, 12(1), pp. 31–39. Available at: [https://doi.org/10.1016/0300-9572\(84\)90056-X](https://doi.org/10.1016/0300-9572(84)90056-X).
- Michels, R., Foschum, F. and Kienle, A. (2008) ‘Optical properties of fat emulsions’, *Optics Express*, 16(8), pp. 5907–5925.
- Mnih, V. *et al.* (2015) ‘Human-level control through deep reinforcement learning’, *Nature*, 518(7540), pp. 529–533. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14236>.
- Moor, M. *et al.* (2023) ‘Foundation models for generalist medical artificial intelligence’, *Nature*, 616(7956), pp. 259–265. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05881-4>.
- Mosconi, L. (2005) ‘Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer’s disease. FDG-PET studies in MCI and AD’, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 32(4), pp. 486–510. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00259-005-1762-7>.
- Munro, I.A. and Garg, M.L. (2013) ‘Prior supplementation with long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids promotes weight loss in obese adults: a double-blinded randomised controlled trial’, *Food & Function*, 4(4), p. 650. Available at: <https://doi.org/10.1039/c3fo60038f>.
- Nantapat, T. *et al.* (2011) ‘Best-So-Far ABC Based Nanorobot Swarm’, in *2011 Third International Conference on Intelligent Human-Machine Systems and Cybernetics. 2011 International Conference on Intelligent Human-Machine Systems and Cybernetics (IHMSC)*, Hangzhou, China: IEEE, pp. 226–229. Available at: <https://doi.org/10.1109/IHMSC.2011.61>.
- Ning, B. *et al.* (2015) ‘Ultrasound-aided Multi-parametric Photoacoustic Microscopy of the Mouse Brain’, *Scientific Reports*, 5(1), p. 18775. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep18775>.
- Nomura, S. *et al.* (2014) ‘Reliability of Laser Speckle Flow Imaging for Intraoperative Monitoring of Cerebral Blood Flow During Cerebrovascular Surgery: Comparison with Cerebral Blood Flow Measurement by Single Photon Emission Computed Tomography’, *World Neurosurgery*, 82(6), pp. e753–e757. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2013.09.012>.
- Nourhashemi, M., Mahmoudzadeh, M. and Wallois, F. (2016) ‘Thermal impact of near-infrared laser in advanced noninvasive optical brain imaging’, *Neurophotonics*, 3(1), p. 015001. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.NPh.3.1.015001>.
- Obésité et surpoids* (no date). Available at: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (Accessed: 1 May 2023).
- Ogawa, S. *et al.* (1990) ‘Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), pp. 9868–9872. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9868>.
- Omarjee, L. *et al.* (2015) ‘Optimisation of movement detection and artifact removal during laser speckle contrast imaging’, *Microvascular Research*, 97, pp. 75–80. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2014.09.005>.
- Ongsulee, P. (2017) ‘Artificial intelligence, machine learning and deep learning’, in *2017 15th International Conference on ICT and Knowledge Engineering (ICT&KE). 2017 15th International Conference on ICT and Knowledge Engineering (ICT&KE)*, Bangkok: IEEE, pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1109/ICTKE.2017.8259629>.
- Optovue OCT & angio OCT* (Californie). Available at: <https://www.oct-optovue.com/> (Accessed: 23 May 2023).

- Osmanski, B.F. *et al.* (2014) 'Functional ultrasound imaging reveals different odor-evoked patterns of vascular activity in the main olfactory bulb and the anterior piriform cortex', *NeuroImage*, 95, pp. 176–184. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.03.054>.
- Oumer, M., Alemayehu, M. and Muche, A. (2021) 'Association between circle of Willis and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis', *BMC Neuroscience*, 22(1), p. 3. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12868-021-00609-4>.
- Pain, F. and Chammas, M. (2023) 'Multiple exposure speckle imaging contrast database obtained in vitro on microfluidic chips for various exposure, channel width, flows and optical magnification'. Recherche Data Gouv. Available at: <https://doi.org/10.57745/KHGHTO>.
- Papadacci, C. *et al.* (2020) '4D Ultrafast Ultrasound Imaging of Naturally Occurring Shear Waves in the Human Heart', *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 39(12), pp. 4436–4444. Available at: <https://doi.org/10.1109/TMI.2020.3020147>.
- Pape, S.A., Skouras, C.A. and Byrne, P.O. (2001) 'An audit of the use of laser Doppler imaging (LDI) in the assessment of burns of intermediate depth', *Burns*, 27(3), pp. 233–239. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(00\)00118-2](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(00)00118-2).
- Park, C.-A. *et al.* (2018) 'Advances in MR angiography with 7T MRI: From microvascular imaging to functional angiography', *NeuroImage*, 168, pp. 269–278. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.01.019>.
- Park, S.-B. *et al.* (2008) 'An improved algorithm for respiration signal extraction from electrocardiogram measured by conductive textile electrodes using instantaneous frequency estimation', *Medical & Biological Engineering & Computing*, 46(2), pp. 147–158. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11517-007-0302-y>.
- Parthasarathy, A.B. *et al.* (2008) 'Robust flow measurement with multi-exposure speckle imaging', *Optics Express*, 16(3), pp. 1975–1989.
- Parthasarathy, A.B. *et al.* (2010) 'Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow in humans during neurosurgery: a pilot clinical study', *Journal of Biomedical Optics*, 15(6), p. 066030. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.3526368>.
- Parthasarathy, A.B., Kazmi, S.M.S. and Dunn, A.K. (2010) 'Quantitative imaging of ischemic stroke through thinned skull in mice with Multi Exposure Speckle Imaging', *Biomedical Optics Express*, 1(1), pp. 246–259. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.1.000246>.
- Pellerin, L. *et al.* (1998) 'Evidence Supporting the Existence of an Activity-Dependent Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle', *Developmental Neuroscience*, 20(4–5), pp. 291–299. Available at: <https://doi.org/10.1159/000017324>.
- Pellerin, L. and Magistretti, P.J. (1994) 'Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), pp. 10625–10629. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>.
- PerfusiX-Imaging (no date) 'PerfusiX-Imaging', *LIMIS Development B.V.* Available at: <https://www.limis.com/perfusix-imaging/> (Accessed: 7 July 2023).
- Petersen, C.C.H. (2003) 'The barrel cortex--integrating molecular, cellular and systems physiology', *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 447(2), pp. 126–134. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1167-z>.
- Petersen, C.C.H. (2007) 'The Functional Organization of the Barrel Cortex', *Neuron*, 56(2), pp. 339–355. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.017>.
- Phillips, A.A. *et al.* (2016) 'Neurovascular coupling in humans: Physiology, methodological advances and clinical implications', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(4), pp. 647–664. Available at: <https://doi.org/10.1177/0271678X15617954>.
- Phinney, S.D. *et al.* (1990) 'Reduced adipose 18:3 ω 3 with weight loss by very low calorie dieting', *Lipids*, 25(12), pp. 798–806. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02535900>.

- Plyer, A. *et al.* (2023) ‘Imaging the vasculature of a beating heart by dynamic speckle: the challenge of a quasiperiodic motion’, *Journal of Biomedical Optics*, 28(04). Available at: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.28.4.046007>.
- Pober, J.S. and Sessa, W.C. (2015) ‘Inflammation and the Blood Microvascular System’, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), p. a016345. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016345>.
- Postnov, D. (2020) ‘DLSI - laser speckle intensity autocorrelation data’. Dryad. Available at: <https://doi.org/10.5061/DRYAD.W6M905QNG>.
- Postnov, D.D. *et al.* (2019) ‘Choosing a laser for laser speckle contrast imaging’, *Scientific Reports*, 9(1), p. 2542. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39137-x>.
- Postnov, D.D. *et al.* (2020) ‘Dynamic light scattering imaging’, *Science Advances*, 6(45). Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc4628>.
- Prasad, A. *et al.* (2019) ‘Current and future functional imaging techniques for post-traumatic stress disorder’, *RSC Advances*, 9(42), pp. 24568–24594. Available at: <https://doi.org/10.1039/C9RA03562A>.
- Provost, J. *et al.* (2014) ‘3D ultrafast ultrasound imaging *in vivo*’, *Physics in Medicine and Biology*, 59(19), pp. L1–L13. Available at: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/59/19/L1>.
- Pujari, A. *et al.* (2021) ‘Optical coherence tomography angiography in neuro-ophthalmology: Current clinical role and future perspectives’, *Survey of Ophthalmology*, 66(3), pp. 471–481. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2020.10.009>.
- Purkayastha, S. and Sorond, F. (2013) ‘Transcranial Doppler Ultrasound: Technique and Application’, *Seminars in Neurology*, 32(04), pp. 411–420. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0032-1331812>.
- Qiu, J. (2010) ‘Spatiotemporal laser speckle contrast analysis for blood flow imaging with maximized speckle contrast’, *Journal of Biomedical Optics*, 15(1), p. 016003. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.3290804>.
- Rahmani, A.M. *et al.* (2021) ‘Machine Learning (ML) in Medicine: Review, Applications, and Challenges’, *Mathematics*, 9(22), p. 2970. Available at: <https://doi.org/10.3390/math9222970>.
- Raichle, M.E. and Gusnard, D.A. (2002) ‘Appraising the brain’s energy budget’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), pp. 10237–10239. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.172399499>.
- Rajpurkar, P. *et al.* (2022) ‘AI in health and medicine’, *Nature Medicine*, 28(1), pp. 31–38. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01614-0>.
- Razny, U. *et al.* (2015) ‘Effect of caloric restriction with or without n-3 polyunsaturated fatty acids on insulin sensitivity in obese subjects: A randomized placebo controlled trial’, *BBA Clinical*, 4, pp. 7–13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.05.001>.
- Refaeilzadeh, P., Tang, L. and Liu, H. (2009) ‘Cross-Validation’, in L. Liu and M.T. Özsu (eds) *Encyclopedia of Database Systems*. Boston, MA: Springer US, pp. 532–538. Available at: https://doi.org/10.1007/978-0-387-39940-9_565.
- Reibel, Y. *et al.* (2003) ‘CCD or CMOS camera noise characterisation’, *The European Physical Journal Applied Physics*, 21(1), pp. 75–80. Available at: <https://doi.org/10.1051/epjap:2002103>.
- Renaudin, N. *et al.* (2022) ‘Functional Ultrasound Localization Microscopy reveals brain-wide neurovascular activity on a microscopic scale’. Zenodo. Available at: <https://doi.org/10.5281/ZENODO.6109803>.
- Richards, L.M. *et al.* (2013) ‘Low-cost laser speckle contrast imaging of blood flow using a webcam’, *Biomedical Optics Express*, 4(10), pp. 2269–2283. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.4.002269>.
- Richards, L.M. *et al.* (2017) ‘Intraoperative multi-exposure speckle imaging of cerebral blood flow’, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral*

- Blood Flow and Metabolism*, 37(9), pp. 3097–3109. Available at: <https://doi.org/10.1177/0271678X16686987>.
- Rivera, D.A. and Schaffer, C.B. (2023) *A quasi-analytic solution for real-time multi-exposure speckle imaging of tissue perfusion*. preprint. Bioengineering. Available at: <https://doi.org/10.1101/2023.04.20.537736>.
- Roggan, Andre *et al.* (1999) ‘Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400–2500 nm’, *Journal of Biomedical Optics*, 4(1), pp. 36–46. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.429919>.
- Roggan, A. *et al.* (1999) ‘The effect of preparation technique on the optical parameters of biological tissue’, *Applied Physics B*, 69(5–6), pp. 445–453. Available at: <https://doi.org/10.1007/s003400050833>.
- Rojas, R. (1996) ‘The Backpropagation Algorithm’, in Rojas, R., *Neural Networks*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 149–182. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-642-61068-4_7.
- Rosenblatt, F. (1961) *Principles of neurodynamics*. CORNELL AERONAUTICAL LABORATORY, INC. Buffalo 21, New York.
- Rosengarten, B., Osthaus, S. and Kaps, M. (2002) ‘Overshoot and Undershoot: Control System Analysis of Haemodynamics in a Functional Transcranial Doppler Test’, *Cerebrovascular Diseases*, 14(3–4), pp. 148–152. Available at: <https://doi.org/10.1159/000065672>.
- Rumelhart, D.E., Hinton, G.E. and Williams, R.J. (1986) ‘Learning representations by back-propagating errors’, *Nature*, 323(6088), pp. 533–536. Available at: <https://doi.org/10.1038/323533a0>.
- Salcedo, I. *et al.* (2012) ‘Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: an emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders: Neurological benefits of GLP-1 receptor activation’, *British Journal of Pharmacology*, 166(5), pp. 1586–1599. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01971.x>.
- Schaeffer, S. and Iadecola, C. (2021) ‘Revisiting the neurovascular unit’, *Nature Neuroscience*, 24(9), pp. 1198–1209. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00904-7>.
- Schmitt, J.M., Yadlowsky, M.J. and Bonner, R.F. (1995) ‘Subsurface Imaging of Living Skin with Optical Coherence Microscopy’, *Dermatology*, 191(2), pp. 93–98. Available at: <https://doi.org/10.1159/000246523>.
- Scholkmann, F. *et al.* (2014) ‘A review on continuous wave functional near-infrared spectroscopy and imaging instrumentation and methodology’, *NeuroImage*, 85, pp. 6–27. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.004>.
- Segur, J.B. and Oberstar, H.E. (1951) ‘Viscosity of Glycerol and Its Aqueous Solutions’, *Industrial & Engineering Chemistry*, 43(9), pp. 2117–2120. Available at: <https://doi.org/10.1021/ie50501a040>.
- Sharif, S.A. *et al.* (2012) ‘Noninvasive clinical assessment of port-wine stain birthmarks using current and future optical imaging technology: a review’, *British Journal of Dermatology*, 167(6), pp. 1215–1223. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11139.x>.
- Sherwin, S.J. *et al.* (2003) ‘One-dimensional modelling of a vascular network in space-time variables’, *Journal of Engineering Mathematics*, 47(3/4), pp. 217–250. Available at: <https://doi.org/10.1023/B:ENGI.0000007979.32871.e2>.
- Sigal, I. *et al.* (2013) ‘Laser speckle contrast imaging with extended depth of field for in-vivo tissue imaging’, *Biomedical Optics Express*, 5(1), pp. 123–135. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.5.000123>.
- Simons, D.J. (1985) ‘Temporal and spatial integration in the rat SI vibrissa cortex’, *Journal of Neurophysiology*, 54(3), pp. 615–635. Available at: <https://doi.org/10.1152/jn.1985.54.3.615>.
- Soares, L.P., Dias, H.C. and Grohmann, C.H. (2020) ‘Landslide Segmentation with U-Net: Evaluating Different Sampling Methods and Patch Sizes’. Available at: <https://doi.org/10.48550/ARXIV.2007.06672>.

- Soleimanzad, H. (2018) *Development and application of quantitative imaging to study cerebral blood flow in a mouse model of obesity*.
- Soleimanzad, H. *et al.* (2019) ‘Multiple speckle exposure imaging for the study of blood flow changes induced by functional activation of barrel cortex and olfactory bulb in mice’, *NeuroPhotonics*, 6(1), p. 015008. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.NPh.6.1.015008>.
- Soleimanzad, H. *et al.* (2020) ‘Obesity in Midlife Hampers Resting and Sensory-Evoked Cerebral Blood Flow in Mice’, *Obesity (Silver Spring, Md.)* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1002/oby.23051>.
- Soleimanzad, H., Gurden, H. and Pain, F. (2017) ‘Development of a multi-exposure speckle imaging for mice brain imaging’, in Q. Luo and J. Ding (eds). *SPIE BiOS*, San Francisco, California, United States, p. 1005110. Available at: <https://doi.org/10.1117/12.2255816>.
- Son, T. *et al.* (2014) ‘Continuous monitoring of arthritis in animal models using optical imaging modalities’, *Journal of Biomedical Optics*, 19(10), p. 106010. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.10.106010>.
- Speakman, J.R. (2019) ‘Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity’, *International Journal of Obesity*, 43(8), pp. 1491–1492. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0363-7>.
- Stebakov, I. *et al.* (2021) ‘Laser speckle contrast imaging and machine learning in application to physiological fluids flow rate recognition’, *Vibroengineering PROCEDIA*, 38, pp. 50–55. Available at: <https://doi.org/10.21595/vp.2021.22013>.
- Stetefeld, J., McKenna, S.A. and Patel, T.R. (2016) ‘Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences’, *Biophysical Reviews*, 8(4), pp. 409–427. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- Strutt, J.W. (1871) ‘XV. On the light from the sky, its polarization and colour’, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 41(271), pp. 107–120. Available at: <https://doi.org/10.1080/14786447108640452>.
- Sun, S. *et al.* (2015) ‘Multi-exposure laser speckle contrast imaging using a high frame rate CMOS sensor with a field programmable gate array’, *Optics Letters*, 40(20), pp. 4587–4590. Available at: <https://doi.org/10.1364/OL.40.004587>.
- Szandała, T. (2020) ‘Review and Comparison of Commonly Used Activation Functions for Deep Neural Networks’. Available at: <https://doi.org/10.48550/ARXIV.2010.09458>.
- Takuwa, H. *et al.* (2011) ‘Reproducibility and variance of a stimulation-induced hemodynamic response in barrel cortex of awake behaving mice’, *Brain Research*, 1369, pp. 103–111. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.007>.
- Tan, C. *et al.* (2018) ‘A Survey on Deep Transfer Learning’, in V. Kůrková *et al.* (eds) *Artificial Neural Networks and Machine Learning – ICANN 2018*. Cham: Springer International Publishing (Lecture Notes in Computer Science), pp. 270–279. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-030-01424-7_27.
- Tanter, M. and Fink, M. (2014) ‘Ultrafast imaging in biomedical ultrasound’, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 61(1), pp. 102–119. Available at: <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2014.2882>.
- Taoka, T. and Naganawa, S. (2018) ‘Gadolinium-based Contrast Media, Cerebrospinal Fluid and the Glymphatic System: Possible Mechanisms for the Deposition of Gadolinium in the Brain’, *Magnetic Resonance in Medical Sciences*, 17(2), pp. 111–119. Available at: <https://doi.org/10.2463/mrms.rev.2017-0116>.
- Tarantini, S. *et al.* (2018) ‘Nrf2 Deficiency Exacerbates Obesity-Induced Oxidative Stress, Neurovascular Dysfunction, Blood–Brain Barrier Disruption, Neuroinflammation, Amyloidogenic Gene Expression, and Cognitive Decline in Mice, Mimicking the Aging Phenotype’, *The Journals of Gerontology: Series A*, 73(7), pp. 853–863. Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/glx177>.

- Telischak, N.A., Detre, J.A. and Zaharchuk, G. (2015) ‘Arterial spin labeling MRI: Clinical applications in the brain: Arterial Spin Labeling MRI’, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 41(5), pp. 1165–1180. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmri.24751>.
- Teng, C.W. *et al.* (2021) ‘Applications of indocyanine green in brain tumor surgery: review of clinical evidence and emerging technologies’, *Neurosurgical Focus*, 50(1), p. E4. Available at: <https://doi.org/10.3171/2020.10.FOCUS20782>.
- Thompson, O., Andrews, M. and Hirst, E. (2011) ‘Correction for spatial averaging in laser speckle contrast analysis’, *Biomedical Optics Express*, 2(4), p. 1021. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.2.001021>.
- Thorens, B. *et al.* (2019) ‘Use of preclinical models to identify markers of type 2 diabetes susceptibility and novel regulators of insulin secretion – A step towards precision medicine’, *Molecular Metabolism*, 27, pp. S147–S154. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.06.008>.
- Tiran, E. *et al.* (2015) ‘Multiplane wave imaging increases signal-to-noise ratio in ultrafast ultrasound imaging’, *Physics in Medicine and Biology*, 60(21), pp. 8549–8566. Available at: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/60/21/8549>.
- Tiran, E. *et al.* (2017) ‘Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent’, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 43(8), pp. 1679–1689. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.011>.
- Tom, W.J., Ponticorvo, A. and Dunn, A.K. (2008) ‘Efficient Processing of Laser Speckle Contrast Images’, *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 27(12), pp. 1728–1738. Available at: <https://doi.org/10.1109/TMI.2008.925081>.
- Tota, S. *et al.* (2010) ‘Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice’, *Behavioural Brain Research*, 209(1), pp. 73–79. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.017>.
- Tournissac, M. *et al.* (2022) ‘Cranial window for longitudinal and multimodal imaging of the whole mouse cortex’, *Neurophotonics*, 9(03). Available at: <https://doi.org/10.1117/1.NPh.9.3.031921>.
- Trinidad López, C. *et al.* (2019) ‘Evaluation of response to conventional chemotherapy and radiotherapy by perfusion computed tomography in non-small cell lung cancer (NSCLC)’, *European Radiology Experimental*, 3(1), p. 23. Available at: <https://doi.org/10.1186/s41747-019-0101-x>.
- Tucker, W.J. *et al.* (2020) ‘Impact of bariatric surgery on cerebral vascular reactivity and cognitive function: a non-randomized pilot study’, *Pilot and Feasibility Studies*, 6(1), p. 21. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40814-020-00569-2>.
- Tucsek, Z. *et al.* (2014) ‘Aging Exacerbates Obesity-induced Cerebromicrovascular Rarefaction, Neurovascular Uncoupling, and Cognitive Decline in Mice’, *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 69(11), pp. 1339–1352. Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/glu080>.
- Vakoc, B.J. *et al.* (2012) ‘Cancer imaging by optical coherence tomography: preclinical progress and clinical potential’, *Nature Reviews Cancer*, 12(5), pp. 363–368. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc3235>.
- Valdes, C.P. *et al.* (2014) ‘Speckle contrast optical spectroscopy, a non-invasive, diffuse optical method for measuring microvascular blood flow in tissue’, *Biomedical Optics Express*, 5(8), pp. 2769–2784. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.5.002769>.
- Varma, H.M. *et al.* (2014) ‘Speckle contrast optical tomography: A new method for deep tissue three-dimensional tomography of blood flow’, *Biomedical Optics Express*, 5(4), p. 1275. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.5.001275>.
- Vaz, P.G. *et al.* (2016) ‘Laser Speckle Imaging to Monitor Microvascular Blood Flow: A Review’, *IEEE reviews in biomedical engineering*, 9, pp. 106–120. Available at: <https://doi.org/10.1109/RBME.2016.2532598>.

- Villringer, A. and Dirnagl, U. (1995) ‘Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging’, *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*, 7(3), pp. 240–276.
- Walsh, I. *et al.* (2021) ‘DOME: recommendations for supervised machine learning validation in biology’, *Nature Methods*, 18(10), pp. 1122–1127. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01205-4>.
- Wang, L. *et al.* (2016) ‘Vessel Sampling and Blood Flow Velocity Distribution With Vessel Diameter for Characterizing the Human Bulbar Conjunctival Microvasculature’, *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, 42(2), pp. 135–140. Available at: <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000146>.
- Wang, Y. *et al.* (2021) ‘Deep learning enhances polarization speckle for in vivo skin cancer detection’, *Optics & Laser Technology*, 140, p. 107006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2021.107006>.
- Wang, Y. *et al.* (2022) ‘Unsupervised and quantitative intestinal ischemia detection using conditional adversarial network in multimodal optical imaging’, *Journal of Medical Imaging*, 9(06). Available at: <https://doi.org/10.1117/1.JMI.9.6.064502>.
- Watanabe, S., Takahashi, T. and Bennett, K. (2017) ‘Quantitative evaluation of the accuracy and variance of individual pixels in a scientific CMOS (sCMOS) camera for computational imaging’, 10071, p. 100710Z. Available at: <https://doi.org/10.1117/12.2251043>.
- Weber, B. *et al.* (2004) ‘Optical imaging of the spatiotemporal dynamics of cerebral blood flow and oxidative metabolism in the rat barrel cortex’, *The European Journal of Neuroscience*, 20(10), pp. 2664–2670. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03735.x>.
- Weber, J., Beard, P.C. and Bohndiek, S.E. (2016) ‘Contrast agents for molecular photoacoustic imaging’, *Nature Methods*, 13(8), pp. 639–650. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3929>.
- Wiering, M. and Van Otterlo, M. (eds) (2012) *Reinforcement Learning: State-of-the-Art*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Adaptation, Learning, and Optimization). Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27645-3>.
- Willemink, M.J. and Noël, P.B. (2019) ‘The evolution of image reconstruction for CT—from filtered back projection to artificial intelligence’, *European Radiology*, 29(5), pp. 2185–2195. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00330-018-5810-7>.
- Willeumier, K.C., Taylor, D.V. and Amen, D.G. (2011) ‘Elevated BMI Is Associated With Decreased Blood Flow in the Prefrontal Cortex Using SPECT Imaging in Healthy Adults’, *Obesity*, 19(5), pp. 1095–1097. Available at: <https://doi.org/10.1038/oby.2011.16>.
- Woitzik, J. *et al.* (2013) ‘Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke’, *Neurology*, 80(12), pp. 1095–1102. Available at: <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182886932>.
- Wu, C.-S., Ballester Rosado, C.J. and Lu, H.-C. (2011) ‘What can we get from “barrels”: the rodent barrel cortex as a model for studying the establishment of neural circuits: The development of rodent whisker barrel map’, *European Journal of Neuroscience*, 34(10), pp. 1663–1676. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07892.x>.
- Xu, M. and Wang, L.V. (2006) ‘Photoacoustic imaging in biomedicine’, *Review of Scientific Instruments*, 77(4), p. 041101. Available at: <https://doi.org/10.1063/1.2195024>.
- Xu, S. *et al.* (2022) ‘Imaging Dynamics Beneath Turbid Media via Parallelized Single-Photon Detection’, *Advanced Science*, 9(24), p. 2201885. Available at: <https://doi.org/10.1002/advs.202201885>.
- Yang, G. *et al.* (2010) ‘Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice’, *Nature Protocols*, 5(2), pp. 201–208. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.222>.
- Yang, X. *et al.* (2022) ‘Neuroprotective Mechanisms of Glucagon-Like Peptide-1-Based Therapies in Ischemic Stroke: An Update Based on Preclinical Research’, *Frontiers in Neurology*, 13, p. 844697. Available at: <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.844697>.

- Yang, Y., Gu, H. and Stein, E.A. (2004) ‘Simultaneous MRI acquisition of blood volume, blood flow, and blood oxygenation information during brain activation’, *Magnetic Resonance in Medicine*, 52(6), pp. 1407–1417. Available at: <https://doi.org/10.1002/mrm.20302>.
- Yu, C.Y., Chammas, M. *et al.* (2023) ‘Design and validation of a convolutional neural network for fast, model-free blood flow imaging with multiple exposure speckle imaging’, *Biomedical Optics Express*, 14(9), p. 4439. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.492739>.
- Yu, H. *et al.* (2021) ‘Convolutional neural networks for medical image analysis: State-of-the-art, comparisons, improvement and perspectives’, *Neurocomputing*, 444, pp. 92–110. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2020.04.157>.
- Yuan, S. *et al.* (2005) ‘Determination of optimal exposure time for imaging of blood flow changes with laser speckle contrast imaging’, *Applied optics*, 44(10), pp. 1823–1830.
- Yudovsky, D. *et al.* (2011) ‘Assessing diabetic foot ulcer development risk with hyperspectral tissue oximetry’, *Journal of Biomedical Optics*, 16(2), p. 026009. Available at: <https://doi.org/10.1117/1.3535592>.
- Zakharov, P. and Scheffold, F. (2009) ‘Advances in dynamic light scattering techniques’, in A.A. Kokhanovsky (ed.) *Light Scattering Reviews 4*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 433–467. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-540-74276-0_8.
- ZEISS Meditec France - Medical Technology | ZEISS France (no date). Available at: <https://www.zeiss.fr/meditec/wbc/zeiss-meditec-france.html> (Accessed: 23 May 2023).
- Zhang, P. *et al.* (2018) ‘High-resolution deep functional imaging of the whole mouse brain by photoacoustic computed tomography *in vivo*’, *Journal of Biophotonics*, 11(1), p. e201700024. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbio.201700024>.
- Zhao, M.Y. *et al.* (2023) ‘Measuring Quantitative Cerebral Blood Flow in Healthy Children: A Systematic Review of Neuroimaging Techniques’, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, p. jmri.28758. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmri.28758>.
- Zhao, Y. *et al.* (2001) ‘Three-dimensional reconstruction of *in vivo* blood vessels in human skin using phase-resolved optical Doppler tomography’, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 7(6), pp. 931–935. Available at: <https://doi.org/10.1109/2944.983296>.
- Zheng, S. *et al.* (2021) ‘Depth resolution in multifocus laser speckle contrast imaging’, *Optics Letters*, 46(19), pp. 5059–5062. Available at: <https://doi.org/10.1364/OL.436334>.
- Zheng, S. and Mertz, J. (2022) ‘Direct characterization of tissue dynamics with laser speckle contrast imaging’, *Biomedical Optics Express*, 13(8), pp. 4118–4133. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.462913>.
- Zilpelwar, S. *et al.* (2022) ‘Model of dynamic speckle evolution for evaluating laser speckle contrast measurements of tissue dynamics’, *Biomedical Optics Express*, 13(12), p. 6533. Available at: <https://doi.org/10.1364/BOE.472263>.

REMERCIEMENTS

Au cours de mes trois années de thèse passées entre le Laboratoire Charles Fabry (LCF) de l'Université Paris-Saclay et le laboratoire de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA) de l'Université Paris-Cité, j'ai eu la chance de mener à bien mon projet de thèse grâce à l'aide précieuse de nombreuses personnes.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude particulière à mon directeur de thèse, Frédéric Pain. Sa guidance et son professionnalisme ont été déterminants pour la réussite de ma thèse. Son expertise dans le domaine de physique et imagerie médicale et sa disponibilité constante pour répondre à mes questions et pour discuter des idées ont été inestimables. Je suis particulièrement reconnaissant pour sa patience et sa compréhension tout au long de ce parcours de recherche. C'est un privilège de travailler avec quelqu'un d'aussi compétent et de soutenant que Frédéric.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, Hirc Gurden, pour sa disponibilité et son expertise en neuroscience. Ses conseils et ses commentaires ont été précieux pour la réalisation des expériences et pour la compréhension des résultats obtenus. Sa connaissance approfondie de l'expérimentation animale et de la neurobiologie ont été cruciales pour la réussite de ce projet. Je lui suis très reconnaissant pour tout ce qui m'a appris et pour son soutien continu.

Je tiens à exprimer ma plus sincère gratitude aux membres de mon jury, Alexandra Fragola, Fabrizio Andreelli, Angelo Pierangelo, et Albertine Dubois d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Leurs évaluations critiques et leurs commentaires constructifs ont été précieux pour faire de ma thèse un succès.

Je remercie chaleureusement Hsin-Hon Lin et Chao-Yueh Yu pour leur dévouement pour la partie d'apprentissage automatique. Leur contribution dans la mise en place des modèles de réseaux de neurones et leur disponibilité pour discuter des idées et pour répondre à mes questions ont été très appréciées. Je salue particulièrement leur bienveillance et leur hospitalité, ainsi que celles de tous les membres de leur équipe de recherche, lors de mon séjour à Taiwan.

Je tiens à remercier Christophe Hecquet, Noam Atlas et Jean-René Rullier pour leur aide technique et la réalisation des parties mécaniques pour notre système. Leurs connaissances approfondies de la mécanique et leurs habiletés à mettre en œuvre les idées ont été essentielles pour la réussite de nos expérimentations.

Je remercie Mondher Besbes pour son support technique dans l'implémentation des réseaux de neurones au LCF.

Je tiens à remercier Patrick Georges, directeur du LCF, pour sa disponibilité, son implication auprès des doctorants et son écoute qui ont été très appréciées.

Je remercie Jean-Christophe Ginefri, mon référent à l'école doctorale, pour sa guidance et ses conseils tout au long de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le personnel administratif du LCF et de BFA pour leur précieuse assistance durant ces trois années de thèse.

Je remercie mes collègues du groupe « Biophotonique » au LCF et du groupe « REGLYS » au laboratoire BFA pour les moments de détente et de bonne humeur partagés ensemble qui ont rendu cette expérience encore plus agréable.

Je suis très reconnaissant envers mes amis, au Liban et en France, pour leur soutien constant qu'ils m'ont apporté tout au long de mon parcours. Je voudrais profiter de cette occasion pour exprimer ma reconnaissance tout particulièrement à Karam. Sa présence et ses encouragements constants ont été essentiels pour me permettre de surmonter les obstacles qui se sont présentés sur mon chemin. Je suis incroyablement chanceux d'avoir une personne aussi extraordinaire dans ma vie.

Enfin, je suis infiniment redevable envers ma famille pour tout l'amour et le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de ma vie, à tous les niveaux. Je remercie mes parents chéris, mes frères et sœurs et leurs familles pour leur support, surtout pendant les moments les plus difficiles à l'étranger. Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à ma mère, dont l'amour inconditionnel a été un pilier essentiel de mon parcours; je lui serai éternellement reconnaissant.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, et sans qui, ce projet n'aurait pu aboutir. Merci encore à tous!

27 Septembre 2023, Palaiseau, France

Marc Chammas

ANNEXES

Tableau A.1. Tableau de conversion de débit ($\mu\text{l}/\text{min}$) en vitesse (mm/s) pour les différents calibres de canaux microfluidiques.

		<i>Diamètre (μm)</i>					
		40	60	80	100	300	500
<i>Débit ($\mu\text{l}/\text{min}$)</i>	1	5.6	3.7	2.8	2.2	0.7	0.4
	2	11.1	7.4	5.6	4.4	1.5	0.9
	3	16.7	11.1	8.3	6.7	2.2	1.3
	4	22.2	14.8	11.1	8.9	3.0	1.8
	5	27.8	18.5	13.9	11.1	3.7	2.2
	6	N.D	22.2	16.7	13.3	4.4	2.7
	7	N.D	25.9	19.4	15.6	5.2	3.1
	8	N.D	29.6	22.2	17.8	5.9	3.6



OPEN

Synthetic exposure with a CMOS camera for multiple exposure speckle imaging of blood flow

M. Chammas & F. Pain

Speckle contrast imaging is an established technique to obtain relative blood flow maps over wide fields of view. A major improvement of the method relies on the acquisition of raw speckle images at different exposure times but requires simultaneous modulation of a laser pulse in duration and intensity and precise synchronization with a camera. This complex instrumentation has limited the use of multiple exposure speckle imaging. We evaluate here the use of a CMOS camera for a simplified approach based on synthetic exposure images created from the sum of successive frames acquired at a 1 ms exposure time. Both methods have been applied to evaluate controlled flows in micro-channels. The contribution of noises to the speckle contrast have been quantified and compared. Dark, readout and shot noise contributions to the total contrast remain constant for modulated exposure, while all these contributions decrease with increasing exposure time for synthetic exposure. The relative contribution of noises to speckle contrast depends on the level of illumination and the exposure time. Guidelines for flow measurements and limitations of the use of a CMOS camera with a limited frame rate for synthetic exposure acquisition scheme are discussed. The synthetic exposure method is simple to implement and should facilitate the translation of multiple exposure speckle imaging to clinical set-ups.

Speckle contrast imaging is an efficient tool to monitor *in vivo* relative blood flow changes and tissue perfusion. It has been used in several medical fields such as rheumatology, dermatology, ophthalmology, and neurology¹. Multiple exposure speckle imaging (MESI) has proven to be more accurate than simple exposure laser speckle imaging for flow quantification due to its ability to differentiate the contribution of static scatterers (i.e. bones, cartilages) from that of the moving scatterers (i.e. red blood cells) to the speckle patterns. In addition, MESI retrieves accurate flows over a much broader linear range and is especially more accurate for large flow variations^{2,3}. Yet, most laboratory and commercial laser speckle contrast imagers still rely on the simple exposure approach as its practical implementation is much simpler^{4,5}. In the MESI system developed previously in our group⁶, the acquisition of multiple exposure relies on a fixed camera exposure associated to laser pulses varying in duration and intensity as proposed previously⁷. This implies the use of an acousto-optic modulator (AOM) associated to an arbitrary waveform generator (AWG) and the precise synchronization of the camera to the laser pulses. This approach has been used by several groups in the last decade to produce most of the multiple exposure speckle contrast *in vivo* datasets in small animals so far^{2,3,6–10}. We investigate here a much simpler and cost-effective instrumental approach. Synthetic exposure images for different exposure times are obtained by the summation of images acquired at a short exposure time (e.g. a 10 ms synthetic exposure image is obtained by the summation of 10 images obtained at 1 ms). This approach has been proposed previously using high sensitivity, low noise SPAD detectors but at the expense of a strongly limited spatial resolution¹¹. Further studies have used synthetic exposure with high frame rate CMOS sensors but no systematic comparison to the laser modulation method was performed as a validation^{12,13}. The present study was designed to compare the synthetic exposure approach using a standard CMOS camera to the laser modulation approach in typical conditions associated with blood flow imaging in mice brain¹⁰. First, we have characterized the noise of the CMOS camera used in the study. Second, we have compared the contributions to the raw speckle data of the different components of noise (dark, readout, shot) in both the synthetic exposure and the modulated laser approaches for increasing exposure times. Third, as the experimental conditions strongly affect the relative contribution of noises, we have studied (i) how the intensity of the detected light affects the shot noise contribution for different exposure times, and (ii) how the noises relative contributions affect differently the speckle contrast data in low flow or high flow conditions. Finally, we have compared noise corrected speckle contrasts and subsequent

Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique Graduate School, CNRS, Université Paris-Saclay, 91127 Palaiseau, France. ✉email: frederic.pain@universite-paris-saclay.fr

decorrelation times derived from both approaches. The limitations of a standard CMOS camera with limited frame rate are discussed considering the limited temporal sampling of the speckle decorrelation and subsequent bias for decorrelation times quantification.

Results

In dynamic speckle imaging, the local contrast is estimated as the ratio of the local standard deviation divided by the local mean of pixels intensities (see Eq. (1) in “Imaging set-up and phantom description”). The underlying concept is that for fast flows, the speckle patterns decorrelates quickly resulting in a low local contrast, while for static areas, the speckle patterns remain identical, and the local contrast is high. The basics of speckle contrast imaging and the imaging instrumental set-up and flow phantoms are described in Methods “[Speckle contrast calculation and relative flow evaluation](#)” and “Imaging set-up and phantom description”. For speckle contrast imaging of a given flow under a fixed illumination, variances in the pixel intensities arise not only from the dynamic speckle patterns fluctuation related to the flow but also from noises (dark, readout, shot noises). In synthetic exposure, the successive addition of frames results in adding the different variances contributions for each pixel. Definition of parameters and equations for noise contribution evaluations are described in the Methods “[Noises evaluation and correction](#)”. To correct for the contributions not related to flow, the contributions of noises should be estimated thoroughly. We first characterize the CMOS sensor noise in “Results”. Then we evaluate the standard deviations corresponding to the raw signal and noises contributions in both acquisition modes (“[Estimation of signal standard deviation contributions in modulated laser and synthetic exposure modes](#)”) and how it affects the speckle contrast calculations (“[Contributions of the noises to the speckle contrast in modulated laser and synthetic exposure modes](#)”). In “[Relative contribution of the shot noise to the contrast as a function of illumination intensity](#)” and “[Relative contribution of shot noise to the contrast as a function of the measured flow](#)” we investigate how the experimental conditions (detected intensity, velocity of the imaged flows) affect the relative contribution of noises to the signal. In “[Comparison of flow quantification from data acquired using modulated laser or synthetic acquisition](#)”, we compare both acquisition modes for relative flow measurements relative and absolute quantification.

Experimental characterization of dark and readout noises for a CMOS sensor. Figure 1 shows the experimental characterization of the dark and readout noises of the Orca Flash 2.8 camera operated in simple exposure mode (e.g., each exposure time corresponds to the acquisition of a single independent image at this exposure). As can be seen, the dark and readout noises are low and homogenous for all pixels (Fig. 1A,B). In addition, the dark and readout noises are spatially homogeneous (Fig. 1C) and temporally invariant (Fig. 1D) making the subtraction of this contribution straightforward for this specific camera.

Estimation of signal standard deviation contributions in modulated laser and synthetic exposure modes. The standard deviation of the signal intensities is at the core of the speckle contrast calculation. The direct subtraction of noise to the signal images allows correction of the pixel intensities, but subtraction leads to an added variance. Uncorrelated variances components are additive. Therefore, the variance due to dark, readout and shot noises should be evaluated and subtracted from the raw variance to obtain a correct estimation of the speckle contrast related to the velocity of the moving red blood cells (see calculation methods and equations in the “[Noises evaluation and correction](#)” Methods section). Figure 2A,B shows the experimental evaluation of the raw, dark and readout noise, and shot noise standard deviation as a function of the exposure time in the modulated laser mode (mode 1) and in the synthetic exposure mode (mode 2). The standard deviation of dark, readout and shot noise remain constant for all exposures for the modulated laser mode whereas the shot noise related variance increases linearly with the number of frames (i.e. the exposure time) in the synthetic exposure mode (the standard deviation increases as the square root function of the exposure time as seen on Supplementary Fig. S1). In mode 1, the amount of detected light is maintained constant for all exposure times by adjusting the laser intensity with the duration and the amplitude of the pulses. Therefore, the shot noise variance and standard deviation remain constant. Contrarily, in mode 2, the computed detected signal adds with the number of frames resulting in a much higher dynamic for the synthetic image than what is allowed by the limited depth well of the pixels. In other words, if a pixel is already close to intensity saturation for a single image at 1 ms exposure time, adding 10 frames will not saturate the synthetic 10 ms image like a real single 10 ms exposure would. Regarding the dark and readout noises, as only one image is read for each exposure time in mode 1, the readout and dark variance and standard deviation are independent of the exposure time, provided that no varying ambient light is recorded, and no temperature changes occur. In mode 2, individual frames are added to create long exposure times, so the dark and readout variance should increase linearly with the exposure time and the standard deviation should increase following the square root of the exposure time. For the shot noise this assumption is met for all exposure times while for the dark noise the standard deviation shows a two terms dependency (sum of square root and a linear term) with the exposure time (see Supplementary Fig. S1). This unexpected linear contribution is predominant for longer exposure time and is likely due to a dark fixed pattern noise becoming significant for the summation of several frames. However, this does not significantly affect the value of the corrected contrast as for long exposure times, σ_{shot} is largely predominant as it is about one order of magnitude larger than that of σ_{dark} .

Contributions of the noises to the speckle contrast in modulated laser and synthetic exposure modes. The metric of interest for flow evaluation in speckle imaging is the local speckle contrast. Figure 2C,D show the raw speckle contrast as well as the contribution of the dark and shot noises contrasts for both acquisition modes as a function of exposure time (see “[Noises evaluation and correction](#)” for calculation methods). As

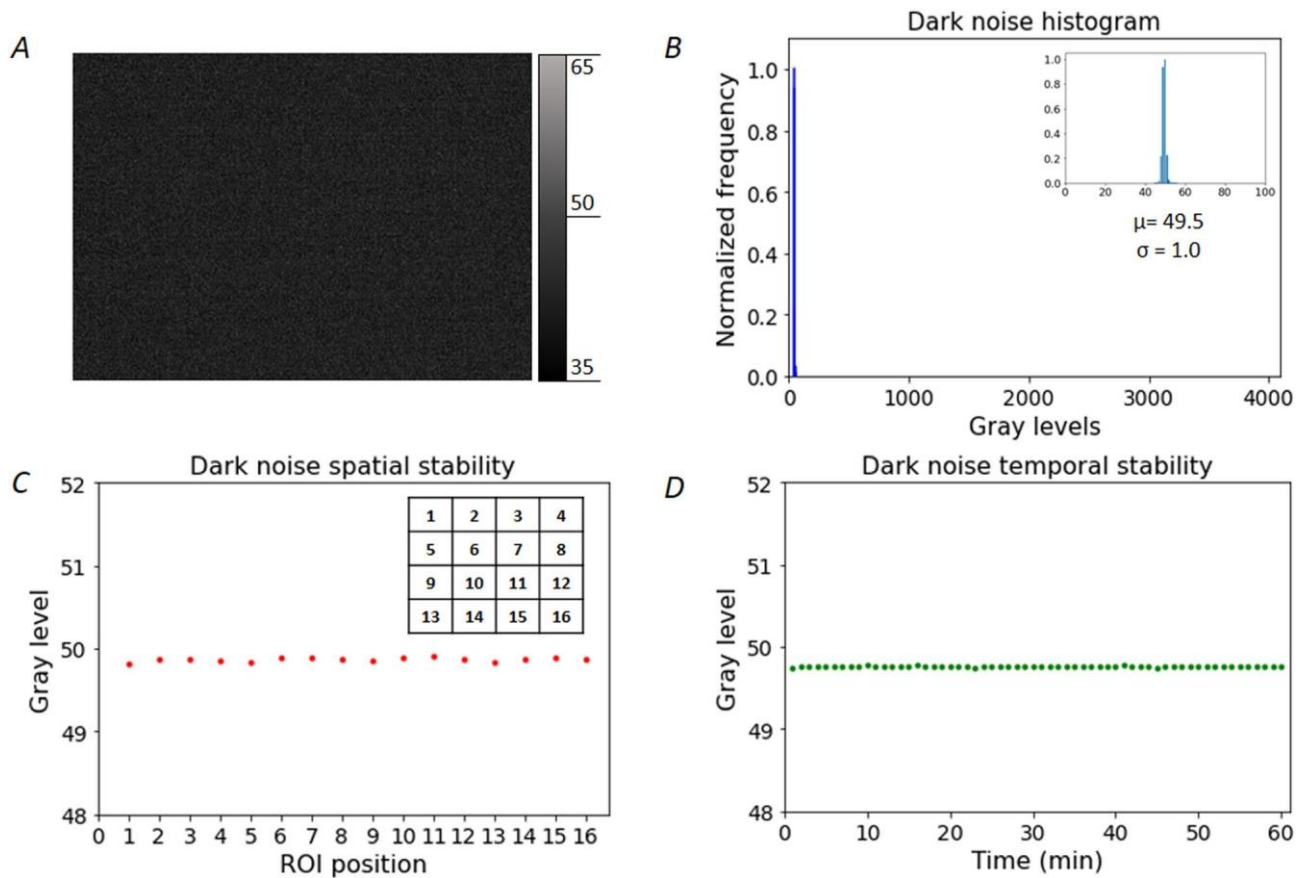


Figure 1. Camera dark and readout noise homogeneity and stability. **(A)** Representative dark image. **(B)** Corresponding histogram of grey levels. Insert is a zoom on non-zero histogram levels. **(C)** Spatial uniformity of noise, the sensor was divided to 16 regions of identical dimensions numbered from 1 to 16. **(D)** Temporal stability of noise evaluated as the mean grey level of the whole sensor.

expected, these contributions remain constant throughout the whole range of exposure times for the modulated laser approach. On the contrary, for synthetic exposures, the contributions to the speckle contrast of the shot and the dark noise contrasts decrease with the exposure time (i.e. the number of added frames). The standard deviation for the shot noise increases as the square root of the number of frames (see Supplementary Fig. S1), whereas the signal increases linearly with the number of frames leading to a theoretical decrease of the contribution of each noise to the speckle contrast as $\sqrt{N I_{one\ frame}}$ (as shown on Supplementary Fig. S2) where N is the number of frames and $I_{one\ frame}$ is the intensity level of one frame in electrons unit. The contributions to the contrast of the shot and dark noises contrasts are significantly lower in mode 2 for all exposures except the shortest ones.

Relative contribution of the shot noise to the contrast as a function of illumination intensity. The relative contribution of the shot noise to the raw speckle contrast depends on the detected signal intensity. In mode 2, the shot noise contribution is determined by the level of detected signal at the lowest exposure time and the number of frames that are added to compute the speckle patterns for each exposure time. Figure 3 shows the influence of the noise correction for different levels of illumination of the sample, ranging from optimal use of the camera dynamic range (quasi saturation of the camera well depth) to sub-optimal level of signal (less than half of the pixels depth well are used). For optimal use of the camera dynamic, the contribution of the shot noise is almost negligible even for the shortest exposure time (Fig. 3A, illumination at 223 mW/cm², $T = 1$ ms). When the signal level is sub-optimal, the relative contribution of the shot noise is significantly higher. This is likely to occur when speckle imaging is carried out over a large field of view as the laser power is distributed over a large surface (Fig. 3A, illumination at 20 mW/cm², $T = 1$ ms). Figure 3B, shows that the relative contribution of shot noise to the contrast increases also when short exposure times are required to catch the contrast variations due to large flows. As a summary, the insert in Fig. 3B shows that the contribution of shot noise to the speckle contrast rises to 15% when speckle patterns are acquired under low illumination and for short exposure time. On the contrary, this contribution is limited to less than 2% for all exposure times when optimal illumination is obtained.

Relative contribution of shot noise to the contrast as a function of the measured flow. The absolute contribution of the shot noise is obviously independent of the flow that is imaged. However, the relative

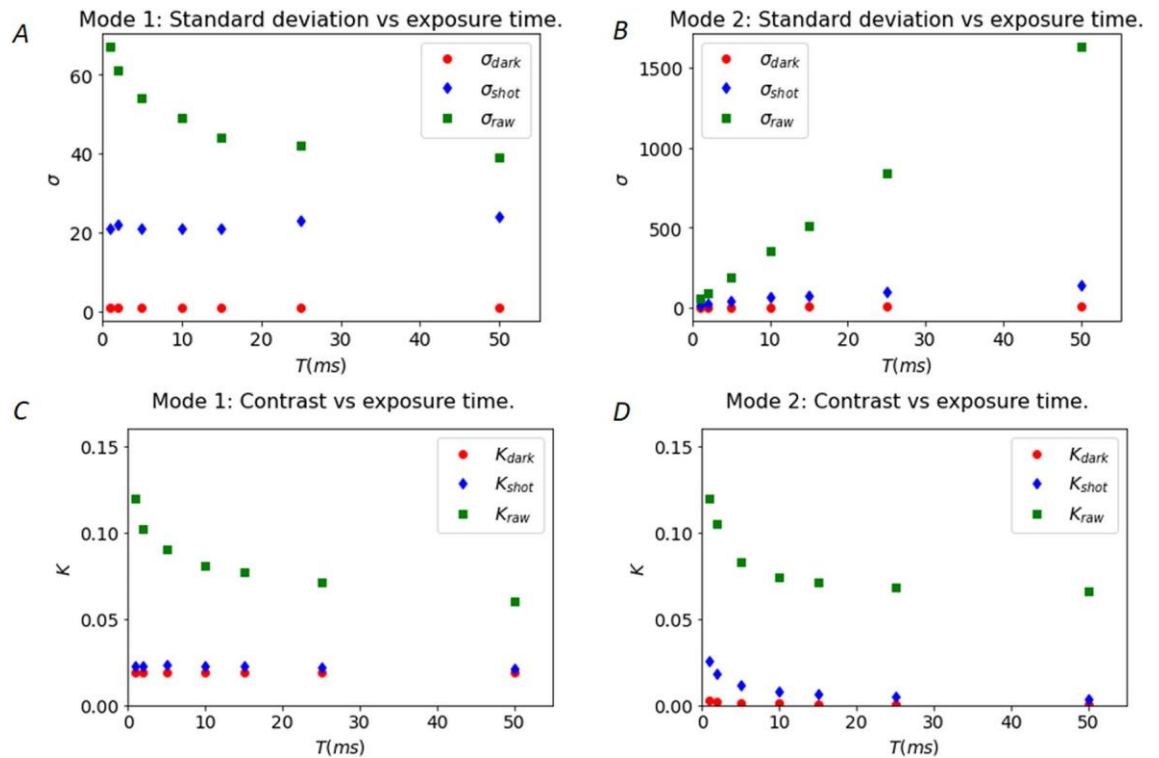


Figure 2. (A) Raw, dark and readout, and shot noise standard deviations in the modulated laser mode as a function of exposure time. (B) Same as (A) for the synthetic exposure mode. (C) Raw, dark and readout and shot noise speckle contrasts for the modulated laser mode. (D) Same as (C) for the synthetic exposure mode.

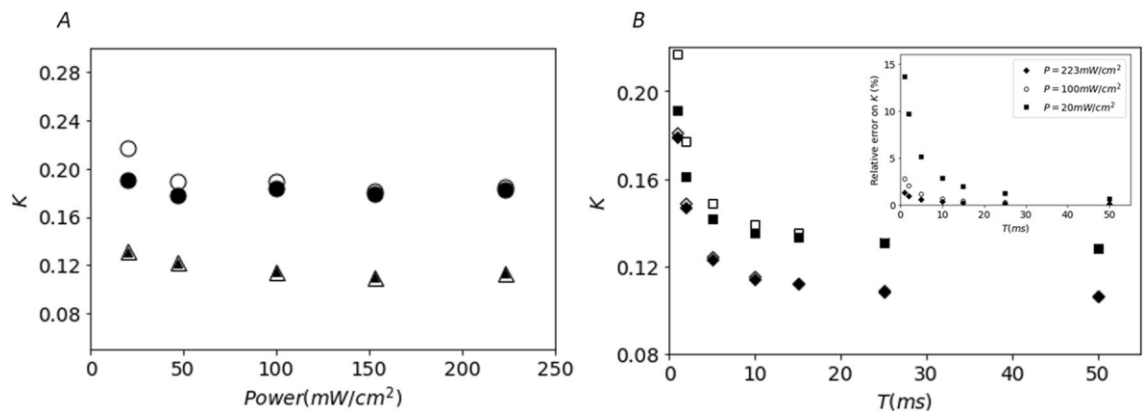


Figure 3. Effect of illumination level and exposure time on the shot noise contribution to the speckle contrast in synthetic exposure mode. (A) Effect of the detected light intensity; empty dots (raw contrast K_{raw}) and filled dots (noise corrected contrast K_{corr}) correspond to an exposure time of 1 ms; empty triangles (K_{raw}) and filled triangles (K_{corr}) correspond to an exposure time of 25 ms. (B) Effect of the exposure time; empty squares (K_{raw}) and filled squares (K_{corr}) correspond to an illumination of 20 mW/cm^2 ; empty diamonds (K_{raw}) and filled diamonds (K_{corr}) correspond to an illumination of 223 mW/cm^2 . Inset: Relative error due to the shot noise speckle contrast as a function of exposure time for different illumination levels; squares, dots and diamonds correspond respectively to illuminations of 20, 100 and 223 mW/cm^2 .

contribution of shot noise to the speckle contrast depends on the value of the flow-related speckle contrast. In dynamic speckle imaging, high flows result in lower contrast whereas low flows lead to higher contrast values. Consequently, for the same level of illumination, the relative contribution of the shot noise to the total speckle contrast varies with the flow being imaged. Figure 4 shows that the relative contribution of noise is much higher for a flow of $8 \mu l \text{ min}^{-1}$ compared to a flow of $2 \mu l \text{ min}^{-1}$ for the whole range of exposure times considered, while as shown previously, the shot noise contribution decreases with the exposure time for all flows. Nevertheless, as data have been acquired under optimal illumination, it can be observed that the error remains below 2%.

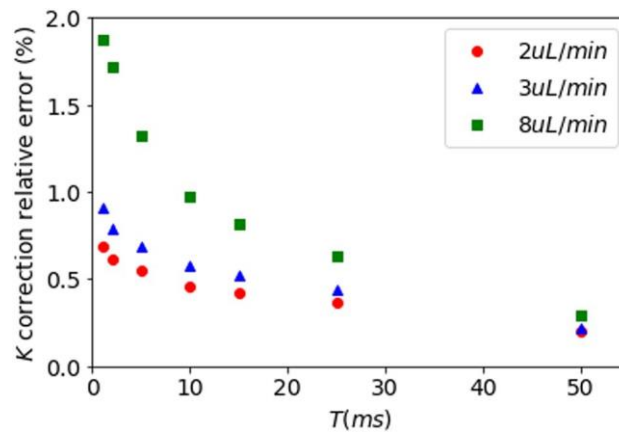


Figure 4. Relative error on contrast calculation due to noises contribution as a function of exposure time for different flows of intralipid-2% in a 300 μm diameter channel. Data have been acquired in synthetic exposure, with frames of 1 ms exposure time, and under optimal illumination using the full dynamic of the camera sensor.

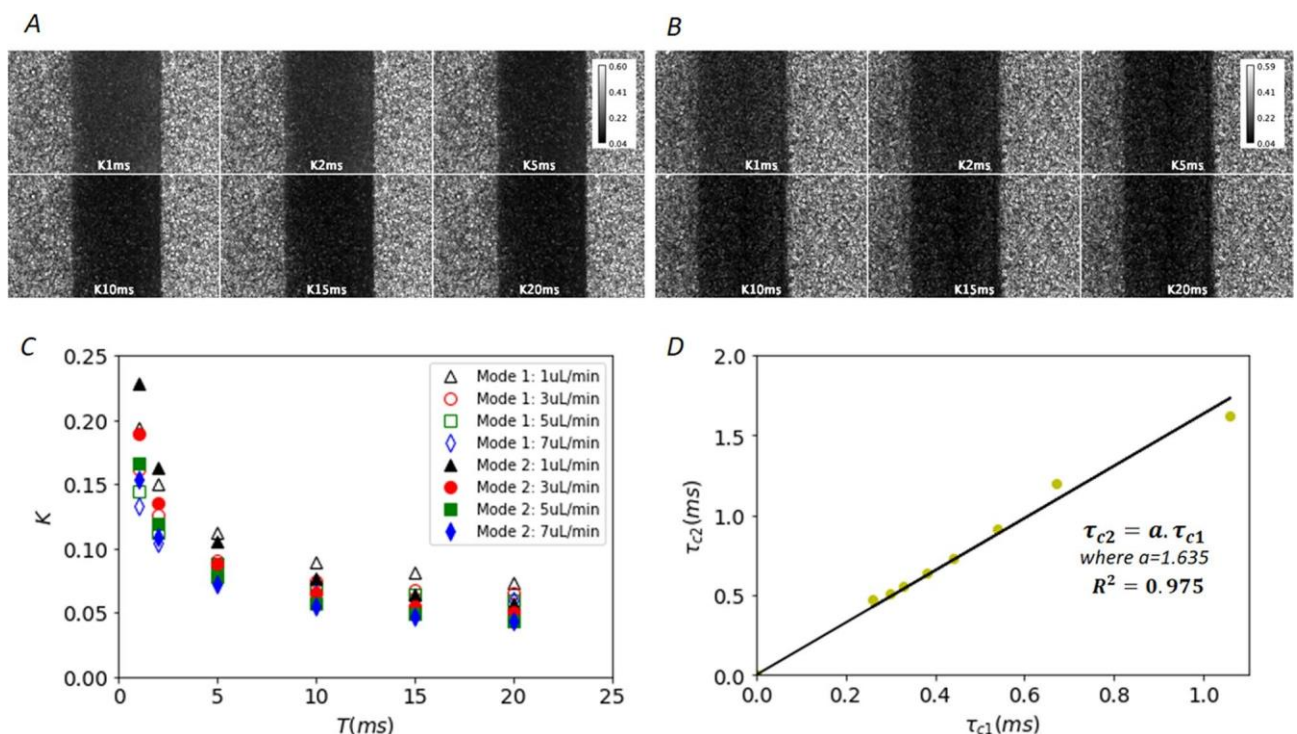


Figure 5. Comparison between mode 1 (laser modulated method) and mode 2 (synthetic exposure). **(A)** Speckle contrast images of intralipid-2% flowing at 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ in a 300 μm diameter channel for 6 exposure times (mode 1). **(B)** Same as **(A)** for mode 2. **(C)** Speckle contrast in both modes for intralipid-2% flowing at 1, 3, 5 and 7 $\mu\text{l}/\text{min}^{-1}$ in a 300 μm diameter channel versus exposure time (1, 2, 5, 10, 15 and 20 ms). Open symbols correspond to mode 1, filled symbols correspond to mode 2. **(D)** Decorrelation times for mode 2 data (τ_{c2}) as a function of those derived from mode 1 data (τ_{c1}) for all flows ranging from 1 to 8 $\mu\text{l}/\text{min}^{-1}$.

Comparison of flow quantification from data acquired using modulated laser or synthetic acquisition. Data were acquired sequentially in both modes for controlled flows between 1 and 8 $\mu\text{l}/\text{min}$ of 2%-intralipid in a 300 μm microchannel. Representative speckle contrast images for 6 different exposure times (1, 2, 5, 10, 15 and 20 ms) are shown for acquisition mode 1 and mode 2 on Fig. 5A,B respectively. Figure 5C shows representative noise corrected speckle contrasts in both modes for flows ranging from 1 to 8 $\mu\text{l}/\text{min}^{-1}$. Figure 5D shows the decorrelation times obtained from the synthetic exposure as a function of those obtained from the modulated laser acquisition. The decorrelation times for different flows are derived from a fit of Eq. (2) to the data (see “[Speckle contrast calculation and relative flow evaluation](#)”). For the phantom used, the decorrelation times measured in the modulated laser mode are within 0–1.2 ms, which is representative of what was observed in vivo in mice using a direct measurement of the intensity autocorrelation function $g_2(\tau)$ (see

Fig. 2D in Postnov et al. 2020¹⁴). Experimental data show a strong linear relationship between the decorrelation times obtained from both acquisition modes, yet the slope is not unity. The decorrelation times derived from mode 2 are significantly higher than those derived from mode 1. The reasons of this difference are not totally clear. Although it prevents absolute quantification of the decorrelation times, the measurement of relative flow changes in the considered range is possible using the synthetic exposure approach. This important point on the biased absolute decorrelation time quantification in mode 2 is further discussed in “Limitations of the synthetic exposure MESI using a standard CMOS camera”.

Discussion

Camera noises contributions to the speckle contrast. In the present study, we use a CMOS camera which was first issued by Hamamatsu in 2012. Its modest specifications in terms of noises and sensitivity compared to more recent sCMOS cameras do not hinder MESI acquisitions in the synthetic exposure mode. Obviously, higher spectral efficiency, and lower dark and readout noise would further decrease the contribution of noise to the speckle contrast, yet the main noise contribution to the speckle contrast arises from the shot noise, which is inherently independent of the camera. However, specifications of common CMOS cameras, even from established manufacturers should be considered cautiously for speckle imaging in the synthetic exposure mode. Indeed, in CMOS cameras, the charge to voltage conversion is independent for each pixel and each column has its own amplifier and analog-to-digital converter, in addition to possible pixel-to-pixel variation in quantum efficiency. The “raw” output from the CMOS image sensor includes pixel-to-pixel variability in the read noise, electronic gain, offset and dark current, which are corrected by the manufacturer in high performance sCMOS cameras¹⁵ but not in regular CMOS cameras. Consequently, standard CMOS usually have moderate to strong inhomogeneous spatial noise (quantified as Dark Signal Non-Uniformity, DSNU), spatial patterns of noise arising from the architecture of the electronics, which should be considered cautiously if systematic noise correction is carried out. Although laser speckle imaging set ups have been implemented with moderate performance cameras like webcams, it is unlikely that such approach would allow unbiased multiple exposure imaging in the synthetic exposure mode¹⁶ as successive frames summation would make the uncorrected noise pattern more visible and ultimately bias locally the speckle contrast calculation.

Illumination level and uniformity. A general guideline for laser speckle imaging is that the illumination of the imaged tissues should be set to maximize the use of the camera dynamics and to minimize the shot noise contribution. The shot noise contribution to the contrast is maximal when the illumination level is sub-optimal (Fig. 3). In the synthetic exposure mode this can be true for low exposure times while longer exposure times benefit from the summation of multiple frames. Similarly, in the study by Valdes et al.¹⁷, the shot noise contribution overwhelms the flow-related speckle contrast for tissues areas with a low signal to noise ratio. The contribution of the shot noise under low illumination could be problematic in the case of clinical application of speckle contrast imaging as practical and safety constraints impose the use of low power laser beams expanded over wide field of view thus limiting the amount of signal¹⁸. In these conditions, the synthetic exposure mode could be particularly interesting compared to the modulated laser mode. It would allow to strongly decrease the shot noise contribution to the speckle contrast for long exposure times requested to probe small flow changes. The interpixel variability in sensitivity and electronic conversion chain is quantified as the photon response non uniformity (PRNU) for CMOS cameras. In recent sCMOS cameras, it is carefully corrected¹⁵ similarly to DSNU avoiding unwanted spatial patterns that could bias the speckle images in the synthetic exposure mode. Another issue, not specific to synthetic acquisition, is the importance of homogeneous illumination for speckle contrast calculation, as inhomogeneous illumination leads to biased flow maps due to inhomogeneous shot noise contributions within the field of view^{19,20}. Although calculating speckle contrast in the temporal dimension solves this issue^{21,22}, in the current implementation of the synthetic exposure mode, the speckle contrast is calculated using spatial kernels and the non-uniformity of field illumination should be minimized or corrected as differences add with the sum of frames.

Relative contribution of noises as a function of the experimental conditions. An important finding from this study is that the relative contribution of noise to the speckle contrast depends on several intermingled experimental parameters. As mentioned above, the amount of available light (laser power per mm² on the sample) is essential, as detected signals far below camera saturation increase the relative contribution of the shot noise to the speckle contrast. Furthermore, the flow that is imaged is an important parameter. Slow flows observed in small arterioles, capillaries and the parenchyma result in slow decorrelation of the speckles and high speckle contrast values, thus minimizing the relative contribution of the noise-related contrasts. On the contrary, imaging fast flows as those observed in arteries or large arterioles is much less favorable since rapid speckle decorrelation leads to low speckle contrast values. In addition, speckle contrast imaging of fast flows requires short exposure times, which could lead to sub optimal illumination. To avoid such discrepancies, we advise a systematic correction of the shot noise related contrast from all speckle contrast data.

Limitations of the synthetic exposure MESI using a standard CMOS camera. The limited frame rate and subsequent non negligible interframe delay is a strong limitation of the synthetic exposure approach using a standard CMOS camera. Indeed, interframe delays should be kept at the shortest values to provide accurate temporal sampling of the decorrelating speckle patterns in respect of the Nyquist-Shannon theorem. The modulated laser approach allows to sample properly the course of the speckle patterns decorrelation as data for each exposure are contiguous (with a null interframe delay). Similarly, previous implementations of synthetic exposure MESI have used (i) single photon avalanche detectors (SPAD) with excellent speed and sensitivity

but limited number of pixels and spatial resolutions¹¹ or (ii) custom CMOS hardware sensors coupled to FPGA allowing frame rates of 15kHz¹² or 1 kHz¹³ respectively with negligible interframe delays (a few μ s) in regards of the decorrelation times. For SPAD, synthetic summation of frames is possible after noise corrections, yet the spatial resolution and the number of "pixels" is coarse. For CMOS detectors contiguous data acquisition requires dedicated electronics and complicated hardware including FPGA treatment and analysis. Our implementation is based on a CMOS camera with a 46 Hz frame rates at full frame up to 714 Hz for a region of interest limited to 50×50 pixels with respective interframes delays of 21 ms and 0.4 ms (see Supplementary Fig. S3). These interframe delays result in the violation of the Nyquist-Shannon theorem when decorrelation times are short and consequently lead to incomplete capture of the temporal pattern of the speckle decorrelation. Still, our experimental data suggest that some of the decorrelation is captured as the comparison with AOM acquired data (with null interframe) demonstrates a linear relationship between the decorrelation times derived from both methods for the same flows. Although the absolute quantification of decorrelation times is out of reach, the implementation of synthetic exposure MESI with a standard CMOS allows to measure relative flow speed changes over a range of decorrelation times that are representative of in vivo biological data obtained using direct autocorrelation measurement (see Fig. 2D in Postnov et al.¹⁴).

Temporal resolution of synthetic exposure mode. The overall temporal resolution of the blood flow measurements is the total duration of the time window of the data required to derive one value of the decorrelation time. In the modulated laser mode, it depends on the number of exposure times used and on the duration of the longest exposure time that sets the constant exposure of the camera. In a standard MESI implementation, 6 exposure times are used ranging from 1 ms up to 20 ms^{9,10}. The total duration of a dataset required for the evaluation of one decorrelation time and the corresponding blood flow index is about 120 ms (6×20 ms). In the synthetic exposure mode, the temporal resolution is limited by the maximum frame rate of the camera. In our implementation, the frame rate ranges from 46fps (full frame sensor) up to 714fps (50×50 pixel ROI) leading to a temporal resolution of 430 ms and 28 ms respectively for 20 images at 1 ms exposure datasets. A resolution of 430 ms is a coarse temporal resolution, yet within the order of magnitude of the characteristic time of physiological blood flow changes. For instance, local increase of cerebral blood flow occurs typically within 0.5–1 s post sensory stimulation^{23–25}.

Guidelines for synthetic exposure using a standard CMOS camera. The synthetic exposure scheme with an off-the-shelf CMOS camera benefits from a straightforward instrumental implementation. An essential feature, regarding the camera choice, is a low, stable, and uniform noise as well as a high sensitivity and a homogenous sensor response. Also, an optimal, homogeneous, and stable illumination is requested to ensure that the full dynamic of the camera is used and to reduce the contribution of shot noise even under unfavorable conditions often met for blood flows analysis in living tissues (short exposure times, fast flows). Ensuring constant illumination over the whole exposure times acquisition is much easier to achieve in the synthetic exposure mode compared to the AOM time-intensity modulation. Indeed, for AOM modulation, the intensity for each pulse has to be pre-calibrated in advance on a reference object and is hardware coded using an arbitrary wavelength generator to modulate the intensities of each laser pulses. This pre-calibration step leads to differences in detected illumination intensities when imaging real biological tissues as the exposed object has a priori unknown heterogeneous optical properties and shapes. The timing and readout speed of the camera is also an essential parameter. As discussed in "[Limitations of the synthetic exposure MESI using a standard CMOS camera](#)", the interframe delay of the camera should be kept to a minimum, ideally null, and it should be at least twice shorter than the measured decorrelation times to ensure proper temporal sampling of the speckle decorrelation. In our implementation, the interframe delay and overall temporal resolution of the multiple exposure data are limited by the frame rate of the camera. Selecting smaller ROIs on the sensor allowed to increase the frame rate and consequently decreased the interframe down to 0.4 ms. For up-to-date CMOS cameras, an ROI of 300×300 pixels result in frame rates up to 900 Hz at 1 ms exposure time. Such high frame rates correspond to interframe delay of 0.1 ms and would fulfill the Shannon-Nyquist theorem for the temporal sampling of most speckle pattern decorrelations for blood flow in vivo. This would allow to get closer to absolute quantification of the decorrelation times which could not be obtained with the camera used in the present study.

Methods

Speckle contrast calculation and relative flow evaluation. For all conditions, contrast images were computed using the following equation:

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} \quad (1)$$

where σ is the standard deviation of the intensities in the acquired image, and $\langle I \rangle$ is the average intensity in the same image. All calculations were done on intensity images in electrons units. A sliding spatial window of 5×5 pixels is used for the calculation of the local contrast over the whole image. The assumption behind the speckle contrast imaging of biological flows is that the flow is inversely proportional to the decorrelation time τ_c of the scatterers. Using multiple exposure contrast images, a model was proposed to derive τ_c while considering the contribution of static scatterers². Equation (2) is fitted to multiple exposure speckle contrast data as a function of exposure time. A non-linear least square approach implemented using Levenberg–Marquardt algorithm was used.

$$K(T, \tau_c) = \beta \rho \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta \rho (1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^2} + v_{noise}^{1/2} \quad (2)$$

where T is the camera exposure time, β is a unitless constant that accounts for spatial averaging of the speckle grains and instrumental parameters, is defined as the ratio of the intensity contribution of mobile scatterers over the total intensity due to mobile and static scatterers, x is the ratio of T over τ_c , and v_{noise} accounts for experimental noises contributions.

The decorrelation time τ_c is derived from the fit and the relative blood flow index (BFI) is defined as

$$BFI = \frac{1}{\tau_c} \quad (3)$$

Imaging set-up and phantom description. The imaging set-up is showed in Fig. 6. A 634 nm laser diode with a maximum output power of 419 mW is used. Images were acquired through a stereomicroscope (Leica MZ16) with a genI sCMOS camera (Orca Flash 2.8, Hamamatsu, Japan). It has a 42% spectral sensitivity at 634 nm, a typical read noise of $3e^-$ and a dark noise of $1e^-$. It is composed of 1920×1440 square pixels. The microfluidic channels fabrication process and flow control set-up were described in details previously⁶. Images were acquired for various flows in microfluidic channels made of clear PDMS with a rectangular section of $300 \mu\text{m}$ widths, $75 \mu\text{m}$ of height and 1 cm of length. The channel is sealed with a lid of clear PDMS, with no static scatterers added. On the basis of previous studies^{23,25}, we used 2%-intralipid as the flowing media since it is easily available in large volumes, non-toxic and its reduced optical scattering coefficient is close to that of flowing blood^{26,27}. Flows from $1 \mu\text{l min}^{-1}$ up to $8 \mu\text{l min}^{-1}$ are controlled using a pressure controller with inline flow feedback (Fluigent, France). In our set-up, these flows correspond to speeds ranging between 0.7 and 5.9 mm s^{-1} representative of blood speeds in capillaries and arterioles.

Multiple exposure acquisition modes. Multiple exposure speckle data were obtained for the following exposure times: 1, 2, 5, 10, 15, and 20 ms. In a first approach, called laser modulation method (Fig. 6C, mode 1), the acquisition of multiple exposure relies on a camera exposure fixed at 50 ms synchronized to laser pulses varying in duration and intensity using an acousto-optic modulator. The width of each pulse is set to the desired exposure duration, while its amplitude is set so that the pulses energies are equalized. The shortest exposure time requires the maximum amplitude, whereas the longest exposure is associated with the lowest amplitude. Contrast images are then calculated for all exposure times using Eq. (1) and τ_c is derived from a fit of the contrast data to Eq. (2). In a second approach, called synthetic exposure (Fig. 6D, mode 2), contrast images are generated using synthetic exposures as follows: the camera exposure time is set to 1 ms and the laser diode power is adjusted to ensure that the maximum dynamic of the sensor is used. 20 independent frames at 1 ms are acquired and contrast images for T : 1, 2, 5, 10, 15, and 20 ms are computed as the sum of the corresponding number of 1 ms-frames. For each exposure time, a single summed-up image was used to evaluate the speckle contrast. When used in full frame, the camera interframe duration Δt is set to 21 ms by the readout speed electronics. Uncorrelated short exposure frames (1 ms) are summed to create longer exposure times. Data at shorter interframe delays have been obtained at the expense of a reduction of image dimension. (Supplementary Fig. S3).

Noises evaluation and correction. Speckle contrast relies on the statistical properties of the local signal intensity and is calculated using Eq. (1) and a 5×5 spatial kernel. Following this method, local uncorrected mean intensity I_{raw} and standard deviation σ_{raw} can be computed from the raw data leading to the raw speckle contrast

$$K_{raw} = \frac{\overline{I_{raw}}}{\sigma_{raw}} \quad (4)$$

However, there are several noises contributions arising from the detector including dark noise, readout noise and shot noise. Here, we evaluate these contributions to obtain the noise-corrected speckle contrast K_{corr} . First, a stack of dark images at 1 ms exposure time is acquired with the laser source off to account for dark and readout noises simultaneously. From these, we evaluate the intensity I_{dark} , variance and standard deviation σ_{dark} and resulting speckle contrast K_{dark} for each synthetic exposure time.

$$K_{dark} = \frac{\overline{I_{dark}}}{\sigma_{dark}} \quad (5)$$

$\overline{I_{raw}}$ and I_{raw} are computed from raw speckle images acquired on a sample (e.g. a channel filled with 2%-intralipid pumped at a precisely known flow). Dark noise intensity is subtracted from each raw image leading to I_{corr} which corresponds to intensities corrected from the dark and readout intensities.

$$I_{corr} = I_{raw} - I_{dark} \quad (6)$$

From this resulting image we can compute the variance σ_{corr}^2 . However, the contribution of dark noise fluctuations σ_{dark}^2 should be subtracted from the variance σ_{corr}^2 .

The contribution of the shot noise obeys to Poisson's statistics with a variance σ_{shot}^2 proportional to the mean resulting in a shot noise related contrast contribution calculated as:

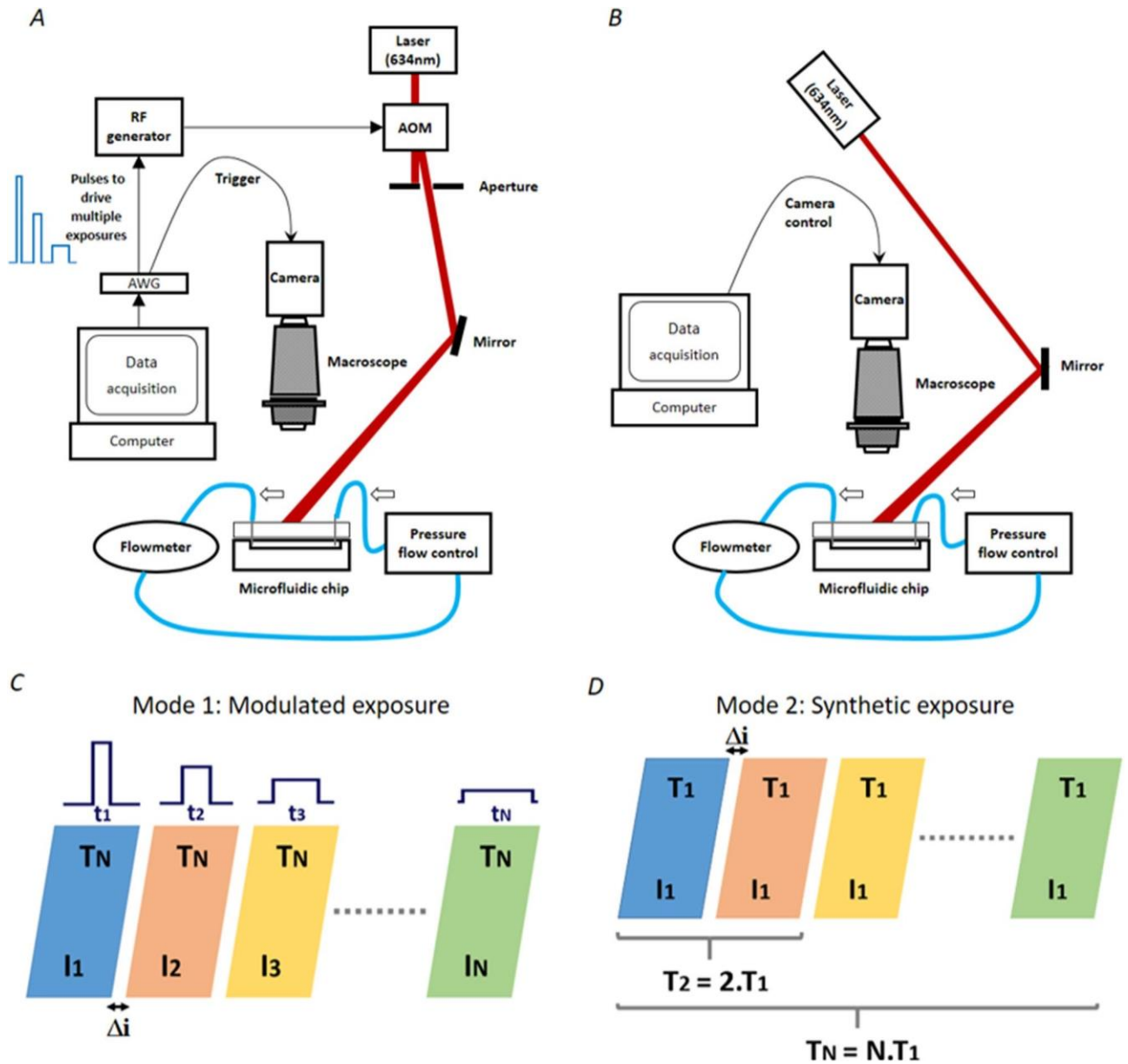


Figure 6. Imaging set-up and acquisition modes **(A)** Modulated laser mode set-up (mode 1). *AWG* arbitrary waveform generator, *AOM* acousto-optic modulator. **(B)** Synthetic exposure mode set-up (mode 2). **(C)** Modulated laser acquisition scheme. *N* is the number of different exposures at which the speckle patterns are recorded. The camera exposure time *T* is fixed and the laser is modulated in duration *t* and intensity *I*. **(D)** Synthetic exposure acquisition scheme. The laser is operated in continuous mode, its intensity *I* is fixed, the camera exposure time is fixed and set to the shortest exposure time *T*₁. For both modes, Δi is the camera interframe time.

$$K_{shot} = \frac{1}{\sqrt{\gamma I_{corr}}} \tag{7}$$

where γ is the ratio of full well capacity of the CMOS sensor to its analog-to-digital conversion bits.

Finally, the speckle contrast corrected for both the shot noise and dark-readout noise is given as¹⁷

$$K_{corr} = \frac{\sigma_{corr}^2 - \sigma_{shot}^2 - \sigma_{dark}^2}{\sigma_{corr}^2} \tag{8}$$

Data availability

The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 9 September 2021; Accepted: 4 March 2022

Published online: 18 March 2022

References

1. Heeman, W., Steenbergen, W., van Dam, G. M. & Boerma, E. C. Clinical applications of laser speckle contrast imaging: A review. *J. Biomed. Opt.* **24**, 1 (2019).
2. Parthasarathy, A. B., Tom, W. J., Gopal, A., Zhang, X. & Dunn, A. K. Robust flow measurement with multi-exposure speckle imaging. *Opt. Express* **16**, 1975–1989 (2008).
3. Kazmi, S. M. S., Richards, L. M., Schrandt, C. J., Davis, M. A. & Dunn, A. K. Expanding applications, accuracy, and interpretation of laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **35**, 1076–1084 (2015).
4. Laser Speckle Contrast Imager | moorFLPI-2. *Moor Instruments*. <https://www.moor.co.uk/products/imaging/laser-speckle-contrast-imager/>.
5. Laser Speckle Contrast Analysis a.k.a. Laser Speckle Contrast Imaging. *Perimed*. <https://www.perimed-instruments.com/content/laser-speckle-contrast-analysis-lasca/>.
6. Soleimanzad, H. *et al.* Multiple speckle exposure imaging for the study of blood flow changes induced by functional activation of barrel cortex and olfactory bulb in mice. *Neurophotonics* **6**, 015008 (2019).
7. Parthasarathy, A. B., Kazmi, S. M. S. & Dunn, A. K. Quantitative imaging of ischemic stroke through thinned skull in mice with multi exposure speckle imaging. *Biomed. Opt. Express* **1**, 246–259 (2010).
8. Parthasarathy, A. B., Weber, E. L., Richards, L. M., Fox, D. J. & Dunn, A. K. Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow in humans during neurosurgery: A pilot clinical study. *J. Biomed. Opt.* **15**, 066030 (2010).
9. Kazmi, S. M. S., Balial, S. & Dunn, A. K. Optimization of camera exposure durations for multi-exposure speckle imaging of the microcirculation. *Biomed. Opt. Express* **5**, 2157 (2014).
10. Soleimanzad, H. *et al.* Obesity in midlife hampers resting and sensory-evoked cerebral blood flow in mice. *Obesity (Silver Spring)* <https://doi.org/10.1002/oby.23051> (2020).
11. Dragojević, T. *et al.* Compact, multi-exposure speckle contrast optical spectroscopy (SCOS) device for measuring deep tissue blood flow. *Biomed. Opt. Express* **9**, 322–334 (2018).
12. Sun, S., Hayes-Gill, B. R., He, D., Zhu, Y. & Morgan, S. P. Multi-exposure laser speckle contrast imaging using a high frame rate CMOS sensor with a field programmable gate array. *Opt. Lett.* **40**, 4587–4590 (2015).
13. Hultman, M., Fredriksson, I., Larsson, M., Alvandpour, A. & Strömberg, T. A 15.6 frames per second 1-megapixel multiple exposure laser speckle contrast imaging setup. *J. Biophoton.* **11**, 33 (2018).
14. Postnov, D. D., Tang, J., Erdener, S. E., Kılıç, K. & Boas, D. A. Dynamic light scattering imaging. *Sci. Adv.* **6**, eabc4628 (2020).
15. Watanabe, S., Takahashi, T. & Bennett, K. Quantitative evaluation of the accuracy and variance of individual pixels in a scientific CMOS (sCMOS) camera for computational imaging. *SPIE* **10071**, 100710Z (2017).
16. Richards, L. M., Kazmi, S. M. S., Davis, J. L., Olin, K. E. & Dunn, A. K. Low-cost laser speckle contrast imaging of blood flow using a webcam. *Biomed. Opt. Express* **4**, 2269–2283 (2013).
17. Valdes, C. P. *et al.* Speckle contrast optical spectroscopy, a non-invasive, diffuse optical method for measuring microvascular blood flow in tissue. *Biomed. Opt. Express* **5**, 2769–2784 (2014).
18. Richards, L. M. *et al.* Intraoperative multi-exposure speckle imaging of cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 3097–3109 (2017).
19. Miao, P., Li, N., Rege, A., Tong, S. & Thakor, N. Model based reconstruction for simultaneously imaging cerebral blood flow and De-oxygen hemoglobin distribution. *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **2009**, 3236–3293 (2009).
20. Rivera, F. P. & Braga Jr, R. A. Illumination dependency in dynamic laser speckle analysis. *Opt. Laser Technol.* **128**, 106221 (2020).
21. Varma, H. M., Valdes, C. P., Kristoffersen, A. K., Culver, J. P. & Durduran, T. Speckle contrast optical tomography: A new method for deep tissue three-dimensional tomography of blood flow. *Biomed. Opt. Express* **5**, 1275–1289 (2014).
22. Dragojević, T. *et al.* High-density speckle contrast optical tomography of cerebral blood flow response to functional stimuli in the rodent brain. *Neurophotonics* **6**, 045001 (2019).
23. Dunn, A. K., Devor, A., Dale, A. M. & Boas, D. A. Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex. *Neuroimage* **27**, 279–290 (2005).
24. Jones, P. B. *et al.* Simultaneous multispectral reflectance imaging and laser speckle flowmetry of cerebral blood flow and oxygen metabolism in focal cerebral ischemia. *J. Biomed. Opt.* **13**, 044007 (2008).
25. Dunn, A. K., Duong, T. Q. & Ress, D. Measurements and modeling of transient blood flow perturbations induced by brief somatosensory stimulation. *Open Neuroimage J.* **5**, 96–104 (2011).
26. Roggan, A., Friebel, M., Doerschel, K., Hahn, A. & Mueller, G. J. Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400–2500 nm. *JBO* **4**, 36–46 (1999).
27. Michels, R., Foschum, F. & Kienle, A. Optical properties of fat emulsions. *Opt. Express* **16**, 5907–5925 (2008).

Author contributions

F.P. and M.C. designed the study and developed the synthetic exposure set-up. M.C. conducted the imaging experiments. M.C. and F.P. analyzed the data. M.C. and F.P. wrote and edited the manuscript. All the authors have reviewed the entire manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08647-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022



Design and validation of a convolutional neural network for fast, model-free blood flow imaging with multiple exposure speckle imaging

CHAO-YUEH YU,^{1,†} MARC CHAMMAS,^{2,†} HIRAC GURDEN,³
HSIN-HON LIN,^{1,4,*} AND FRÉDÉRIC PAIN^{2,5} 

¹Chang-Gung University, Department of Medical Imaging and Radiological Sciences, Taoyuan City, Taiwan

²Université Paris-Saclay, Institut d'Optique Graduate School, CNRS, Laboratoire Charles Fabry, 91127, Palaiseau, France

³Université Paris Cité, CNRS, Laboratoire Biologie Fonctionnelle et Adaptative, 75013, Paris, France

⁴Department of Nuclear Medicine, Chang Gung Memorial Hospital, Linkou, Taiwan

⁵frederic.pain@universite-paris-saclay.fr

[†]These authors contributed equally to this work.

*hh.lin@mx.nthu.edu.tw

Abstract: Multiple exposure speckle imaging has demonstrated its improved accuracy compared to single exposure speckle imaging for relative quantitation of blood flow *in vivo*. However, the calculation of blood flow maps relies on a pixelwise non-linear fit of a multi-parametric model to the speckle contrasts. This approach has two major drawbacks. First, it is computer-intensive and prevents real time imaging and, second, the mathematical model is not universal and should in principle be adapted to the type of blood vessels. We evaluated a model-free machine learning approach based on a convolutional neural network as an alternative to the non-linear fit approach. A network was designed and trained with annotated speckle contrast data from microfluidic experiments. The neural network performances are then compared to the non-linear fit approach applied to *in vitro* and *in vivo* data. The study demonstrates the potential of convolutional networks to provide relative blood flow maps from multiple exposure speckle data in real time.

© 2023 Optica Publishing Group under the terms of the [Optica Open Access Publishing Agreement](#)

1. Introduction

Blood flow is one of the paramount parameters monitored for diseases diagnosis or treatment follow-up in various medical fields. For instance, blood flow measurement is an indicator of the skin's healing capability from burns, tissue's viability during surgery or an impaired vasodilatory response in metabolic diseases such as diabetes [1].

Laser speckle contrast imaging (LSCI) has emerged as a non-invasive, contactless, and tracer-less technique for blood flow assessment in micro-vessels [2]. It is based on the reflectance imaging of tissues illuminated with coherent light. Speckle patterns arise from the interference of backscattered photons with different path lengths. Moving particles in the field of view, i.e., red blood cells (RBCs), cause spatiotemporal fluctuations of the speckle pattern in the image plane. In the spatial domain, these fluctuations can be seen as image blurring. In LSCI, the spatial speckle contrast (K) quantifies the extent of this spatial blurring and is defined as:

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} \quad (1)$$

where σ represents detected intensities standard deviation and $\langle I \rangle$ represents detected average intensity, all calculated locally typically using a spatial (5 × 5) sliding window. The speckle contrast theory developed by Goodman [3] demonstrates the relationship between the contrast, the camera exposure time T and the scatterers decorrelation time τ_c . The Inverse Correlation

Time $1/\tau_c$ (ICT) was experimentally demonstrated to be proportional to the scatterers' velocity, but the exact relationship is not known as it depends on several unknown parameters (scatterers shape, dimension, and probability distribution) [4]. For further reviews on speckle imaging instrumentations and applications see [4,5]. Multiple exposure speckle imaging (MESI) is a significant upgrade of LSCI. It has been introduced to improve the accuracy of relative blood flow estimation in presence of static scatterers and experimental noises [6]. Briefly, a mathematical model that includes noise and static scatterers contributions is fitted to speckle contrast images obtained for different exposure times. The obtained ICT scales linearly with the flow, which is not the case for LSCI in the presence of static scatterers or for large flows [7–9].

Despite its better accuracy compared to LSCI, MESI suffers from the need to acquire several exposure images followed by a pixelwise non-linear fit to a multiparametric model. MESI acquisition can be cumbersome and subsequent data analysis is computationally intensive, preventing real-time analysis. Therefore, most laboratory systems and all commercial speckle imaging systems either for pre-clinical or clinical applications still rely on LSCI. For fast MESI data acquisition, previous developments have used custom fast CMOS sensors associated to field programmable gate arrays (FPGA). These architectures allow MESI data recording in a synthetic exposure mode, strongly decreasing the duration required for acquisition of a set of multi-exposure frames [8,10]. Implementation of MESI synthetic exposure acquisition with a standard CMOS was also demonstrated provided that noise contributions are accurately evaluated and subtracted [11]. For fast computation of blood flow maps from MESI data, recent developments have focused on using neural networks to bypass the computer intensive burden of the non-linear fitting step. Most of the proposed networks were trained using simulated MESI speckle data [12,13] or using experimental LSCI speckle data obtained experimentally for flows in a single large diameter channel [14]. Surprisingly, most reported studies used simple artificial neural networks (ANNs), whereas convolutional neural networks (CNNs) are inherently expected to perform better for image analysis due to their ability to extract local relevant features automatically [15]. In recent years, CNN has gained considerable attention in image-to-image translation, such as denoising, super-resolution, and prediction [16] and has already found application in laser speckle reduction [17] and denoising of laser speckle imaging [18]. Recently, a study has proposed the use of CNN for analysis of speckle contrast imaging data. The network was trained and validated *in vitro* with experimental speckle data obtained using a disk covered with diffusive paint with controlled rotation speeds to emulate flows [19]. The aim of the present study is to evaluate the performances of two architectures of CNNs and compare them to the non-linear fit approach to derive blood flow maps from *in vivo* MESI data. First, we build an experimental dataset of MESI contrast images using microfluidic phantoms for a physiological range of blood vessels diameters and flows. Second, we use this dataset to train different CNN architectures. Third, we compare the performances of the CNN approach to the non-linear fit approach. Two residual CNN architectures (multiple-stream residual CNN and three-dimensional residual CNN) focusing on spatial and exposure times features were tested to predict blood flow maps from MESI data. Finally, the analysis of *in vivo* MESI data was carried out with the CNN architecture with the best performances and compared to the non-linear fit approach.

2. Materials and methods

2.1. MESI set-up and speckle contrast images database building

The imaging set-up is showed in Fig. 1. A 633 nm laser diode (SGL, Shanghai, China) is used. Images were acquired with a sCMOS camera (Orca Flash 2.8, Hamamatsu, Japan) through a stereomicroscope (Leica MZ16). Images are composed of 1920×1440 square pixels. MESI data were obtained for the following exposure times: 1, 2, 5, 10, 15, and 25 and 50 ms and for two magnification levels of the optics ($\times 2.5$ and $\times 6$) corresponding to fields of view of 3×2.1 mm² and 1.1×0.9 mm² respectively. For all conditions, speckle contrast images K at different

exposure times were generated using the MESI synthetic exposure technique as detailed in [11] with a 5×5 sliding window and Eq. (1).

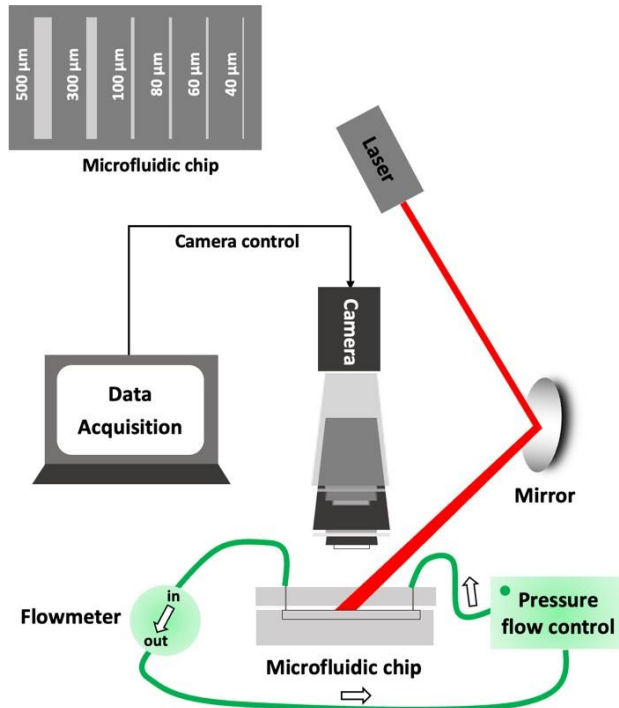


Fig. 1. MESI synthetic exposure imaging set-up. A speckle contrast images database was acquired for different exposure times, flows and channels diameter using a microfluidic system (pressure flow control, flowmeter, and a microfluidic chip) with 2%-intralipid as flowing media. Insert: microfluidic chip including 40, 60, 80, 100, 300 and 500 μm diameter channels.

The microfluidic set-up was described in detail previously [9]. Speckle contrast images were obtained for various flows in microfluidic channels with diameters of 40, 60, 80, 100, 300 and 500 μm. We used 2%-intralipid as flowing media as it provides a reduced scattering optical coefficient close to that of flowing blood [20,21]. For the database construction, flows of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 μl/min have been used. These flows are representative of microcirculation blood velocities in the mice brain (speed ranging from 0.5 to 30 mm/s) [7,22]. All flow values have been used to generate the database except for the 40 μm channel where the highest achievable flow with reliable stability was 5 μl/min. Representative speckle contrast images from the database are shown in Fig. 2. The complete dataset is available on an institutional repository and referenced as [Dataset 1](#) [23].

2.2. Non-linear fitting on speckle contrast data for blood flow estimation

Contrast images are computed using Eq. (1). A sliding spatial window of 5×5 pixels is used for the calculation of the local contrast over the whole image. For exposure times greater than 1 ms, the speckle contrast is calculated after frames summation and noises correction as detailed in [11]. Equation (2) is fitted to MESI data as a function of exposure time.

$$K(T, \tau_c) = \left\{ \beta \rho^2 \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta\rho(1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^2} + u_{\text{noise}} \right\}^{1/2} \quad (2)$$

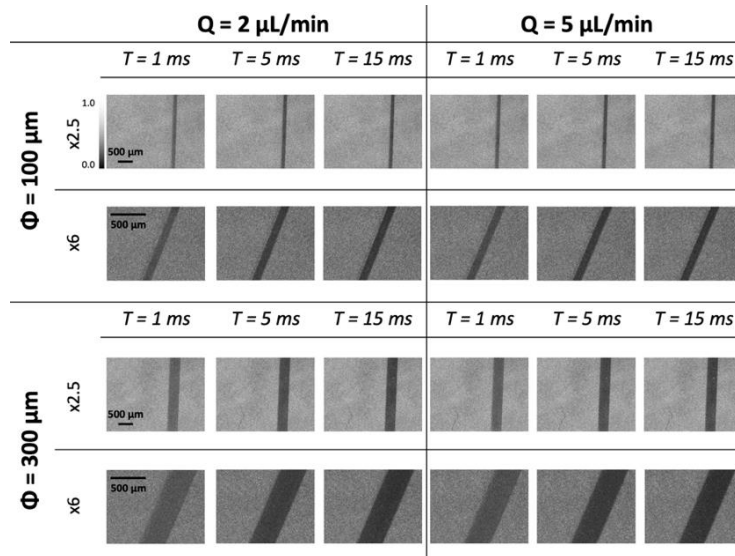


Fig. 2. Speckle contrast database sample images. Representative speckle contrast images are shown for $Q = 2 \mu\text{L}/\text{min}$ and $Q = 5 \mu\text{L}/\text{min}$, 2 different channels diameters $\Phi = 100 \mu\text{m}$ and $\Phi = 300 \mu\text{m}$ and two magnification levels ($\times 2.5$ and $\times 6$). In each case, contrast images are shown for three exposure times ($T = 1 \text{ ms}$, $T = 5 \text{ ms}$ and $T = 15 \text{ ms}$).

T is the camera exposure time, β is a unitless constant that accounts for spatial averaging of the speckle grains, ρ is the ratio of the intensity contribution of mobile scatterers over the total intensity due to mobile and static scatterers, x is the ratio of T over τ_c , and v_{noise} accounts for all experimental noises contributions [6]. Before the non-linear fit of the model to the experimental data, β was fixed after evaluating the maximum achievable speckle contrast for our imaging set-up using all the pixels of the speckle image of a reflectance standard [24]. A non-linear least-square approach implemented using Levenberg-Marquardt algorithm was used (curve_fit function from Scipy.optimize in Python 3.9). The decorrelation time τ_c derived from the non-linear fit allows calculation of the Inverse Correlation Time (ICT) used as the metric for the relative blood flow change.

2.3. Framework of CNN-based blood flow prediction from MESI data

2.3.1. Patch extraction and reference flow map preparation

The overall architecture of the proposed patch-based blood flow prediction from MESI data is shown in Fig. 3. CNN-based methods need large numbers of samples. This requirement cannot be easily met in practice, especially for pre-clinical optical imaging. In this study, we proposed to use randomly sampling patches in the speckle contrast images. The advantage of this strategy is that it detects the small features of local regions while increasing the number of samples considerably. For supervised training, input pairs of speckle contrast images and ground truth flow maps are required. Experimental speckle images are acquired from channels with controlled geometrical parameters and with controlled flows accurately measured in-line. Yet, this value is an average flow inside all the channel. The reference velocity maps accounting for velocities distributions inside the channels were generated by numerically solving the Navier-Stokes equation for fluid dynamics in laminar permanent flow based on the geometry and average flow rate of microchannels. A rigid transformation was then used to align the generated reference image with the channel position in the contrast images. During the network training phase, patches (128×128

pixels) containing the microfluidic channel are randomly selected from speckle contrast images, while the corresponding patches for the learning target are simultaneously extracted from the reference flow map at the same location. Data augmentation with image rotation was further applied to simulate different orientations of blood vessels within the speckle images. During the prediction phase, the speckle contrast image was spilt into uniform half-overlapped patches that were then fed into the CNN in sequential order. A full flow map is then assembled from the predicted flow patches using the 64×64 central parts of the 128×128 patches inferred. This allows to have no overlap on the output map, yet no visible border effects as well due to the use of overlapping inputs. A flowchart of patches inference and re-assembly is provided as supplementary Figure S2.

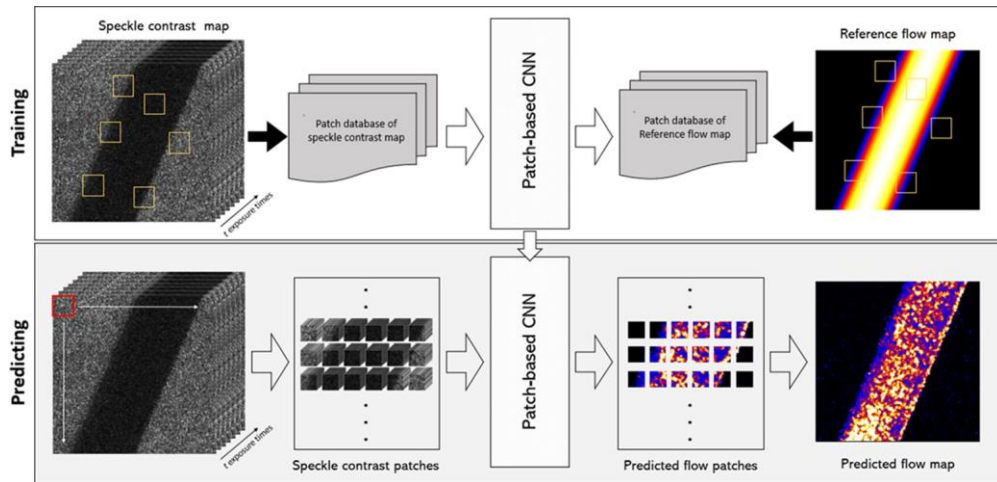


Fig. 3. The working pipeline of the proposed patch-based flow prediction method. Patches (128×128 pixels) for speckle contrast images and reference flow map were randomly extracted within the microfluidic channels. The datasets of the training pairs were used to train the proposed CNN architectures. For the prediction stage, each patch of the speckle contrast images was processed by the trained network. The predicted flow patches were then reassembled to form the output flow map.

2.3.2. Network architectures

To predict flow maps from MESI images in an end-to-end fashion, we developed two neural network architectures based on residual neural network (Res-Net) model focusing on spatial features and the correlation information between frames acquired at different exposure times. Figure 4(a) presents the multiple-stream residual network (MSR-Net), which is divided into seven sub-streams, each corresponding to one exposure time. The speckle contrast patches along the dimension of exposure times are the inputs for each stream. Each stream of the network architecture contains B residual blocks with identical layout. The residual block comprises two-dimensional convolution (Conv) layers (8 feature channels, 3×3 filter with a stride of 1 and replication padding) with batch normalization (BN) and leaky rectified linear unit (leaky ReLU) layers. The features obtained at the output of each stream are concatenated and passed to the subsequent output stream. A shortcut connection within each residual block is applied to perform identity mapping and skip the two Conv layers to avoid the vanishing gradient problem [25]. The number B of residual blocks was progressively increased to evaluate the best trade-off between features extraction and network convergence and time required for training. In principle,

the network learns the appropriate combinations of features from the seven streams to predict the final flow map.

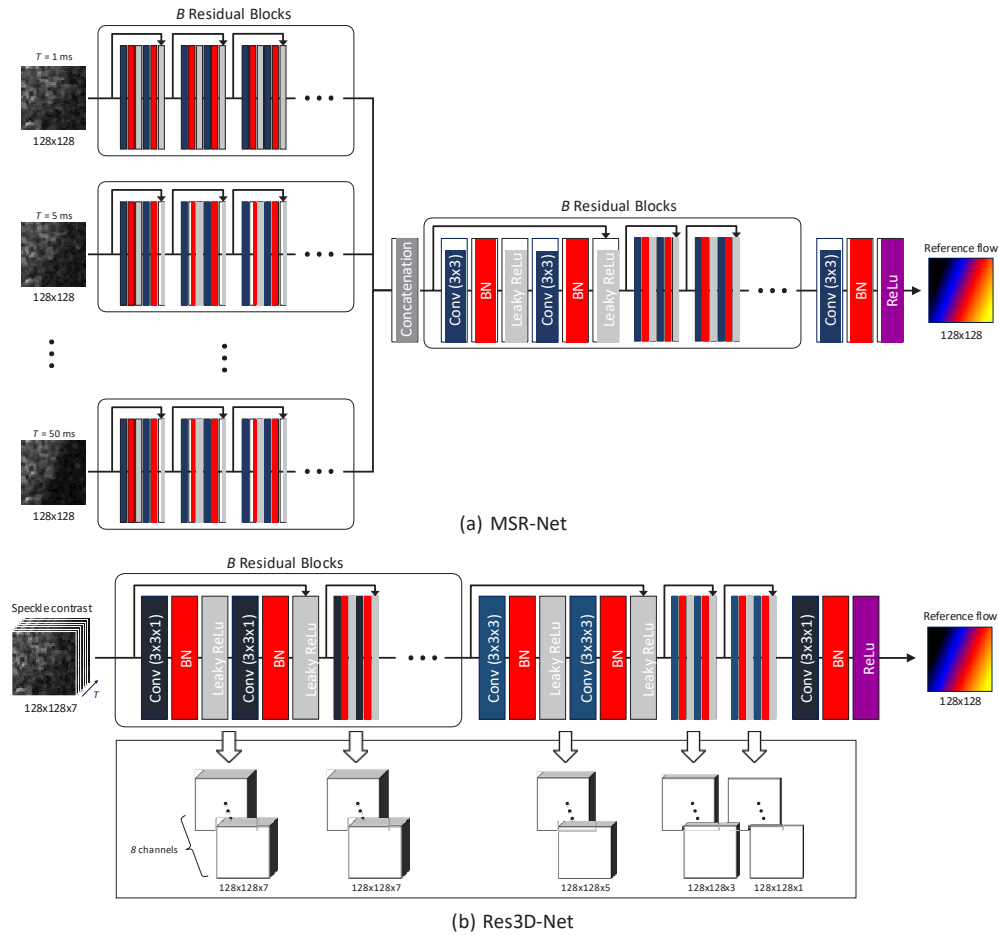


Fig. 4. Architecture of the two residual neural networks proposed for blood flow prediction from multiple exposure speckle patches.

Figure 4(b) presents the architecture of a residual 3D convolution neural network (Res3D-Net). The input of the network is a stack of speckle contrast patches with sequentially increasing exposure times. The proposed Res3D-Net is based on 3D residual blocks to learn the spatial-exposure features. The first B 3D residual blocks (8 feature channels, $3 \times 3 \times 1$ filter with a stride of 1 and replication padding) serve as the joint-spatial feature extractor across multiple exposure speckle contrast images. At the end of the feature extractor, the generated features are then fed into three spatial-exposure residual blocks (8 feature channels, 3×3 filter with a stride of 1, replication padding along spatial dimension, and no padding along exposure time dimension). The strategy of no padding along the exposure time dimension allows for a gradual extraction of neighboring exposure features from local to global information while preserving input distribution along the borders of the exposure time dimension.

2.3.3. Network training

We used a five-fold cross-validation method to evaluate the performances of the two networks. This allows a robust estimation of the model performances bias and variances [26]. The patch dataset is composed of 18,000 patches obtained by random sampling of 200 patches from each of 90 MESI data sets corresponding to different experimental parameters (5 flows for the 40 μm diameter channel, 8 flows for all other 5 channel dimensions, all at two optical magnification). The patches pairs were obtained from experimental speckle contrasts images and associated ground truth flow maps as detailed in section 2.3.1. The entire dataset was used for part-to-part training and validation. The patches were randomly gathered into five groups each with the same number of patches. The patch from a single microfluidic parameter could be found only in one of the groups. Each group, therefore, contained data from a couple of microfluidic parameters (different flows, microfluidic diameters, and magnification levels), referred to as microfluidic parameter-wise cross-validation. The microfluidic parameter-wise cross-validation was implemented to test the generalization capability of the network for flow prediction under different microfluidic parameters. To compare the performance of our network with non-linear fitting methods, we further tested the network without five-fold cross-validation. Each speckle image was split in half horizontally, then the top half was used for training and the bottom half as testing. Each top half of the 90 speckle images is randomly sampled into 200 patches, resulting in a training dataset composed of 18,000 patches and their associated ground truth flow patches. In contrast with the cross-validation method described above, the patches in the training data set cover all microfluidic parameters. The resulting trained network was first applied to process testing data from the microfluidic flow phantoms, and second it was applied to process *in vivo* MESI data, and to compare the network results with the non-linear fitting method applied to the same data. Both network architectures were trained using MATLAB R2021a on a workstation (NVIDIA Quadro GV100 GPU, 32 GB RAM). Weights for convolution were initialized with the Xavier initializer. Mean squared error (or L2 loss) and Adaptive Moment Estimation (ADAM) optimizer were used for optimizing weights and biases, with a learning rate of 0.01, and momentum of 0.9. A mini batch of size 100 is adopted for model training. All networks were trained for 50 epochs, which was empirically determined through loss curves and consistent across all the folds. The trained model is converted to ONNX (Open Neural Network Exchange) format for deploying into different platforms.

2.4. Evaluation metrics

To evaluate the performances of the two networks, we measured the mean absolute error (MAE), root mean squared error (RMSE), peak signal-to-noise ratio (PSNR), mean absolute percentage error (MAPE), and structural similarity index metrics (SSIM) [27] between predicted flow image and the reference flow image.

$$\text{MAE} = \frac{1}{M} \sum_{i \in M} |f_i - \hat{f}_i| \quad (3)$$

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i \in M} (f_i - \hat{f}_i)^2} \quad (4)$$

$$\text{PSNR} = 20 \cdot \log_{10} \frac{\text{MAX}}{\text{RMSE}} \quad (5)$$

$$\text{MAPE} = \frac{100\%}{M} \sum_{i \in M} \frac{|f_i - \hat{f}_i|}{\hat{f}_i} \quad (6)$$

$$\text{SSIM} = \frac{(2\mu_{\hat{f}}\mu_f + C_1)(2\sigma_{\hat{f}f} + C_2)}{(\mu_{\hat{f}}^2 + \mu_f^2 + C_1)(\sigma_{\hat{f}}^2 + \sigma_f^2 + C_2)} \quad (7)$$

where M is the total number of pixels; f_i and \hat{f}_i denote the flow rate at pixel i for the predicted and reference flow maps, respectively. MAX indicates the maximum intensity value of the evaluated image. C_1 and C_2 are constant parameters, while $\mu_{\hat{f}}$, μ_f , $\sigma_{\hat{f}}$, σ_f and $\sigma_f\sigma_{\hat{f}}$ are images statistics (means and standard deviations).

2.5. *In vivo* experiments

All experiments were performed in accordance with the European Directive 2010/63/UE (Ethical project #CEB-03-2018) regarding the care and use of laboratory animals. MESI recordings were carried out in a 4-months old, anesthetized mouse (male, C57BL6, mean weight = 48 g) after a craniotomy was performed over the barrel cortex. The surgical protocol was described previously [9]. A whiskers' stimulation protocol was applied to visualize the blood flow change in the medial cerebral artery (MCA) in particular. Mouse's whiskers were stimulated unilaterally with a cotton swab attached to a servomotor ($f = 2 \text{ Hz} \pm 60^\circ$) driven and synchronized with acquisition start using an Arduino microcontroller. A trial recording consisted of a baseline phase (10s) followed by mechanical stimulation of the whiskers phase (30 s) and finally a rest phase (30 s). MCA images were acquired on the contralateral side of whiskers being stimulated. For the analysis of *in vivo* data both techniques (CNN method and non-linear fitting method) were compared on Python 3.9 using Intel Xeon Gold 6244 CPU @ 3.60 GHz 16/32 physical/logical cores.

3. Results

3.1. Speckle contrast database

Figure 5 shows representative speckle contrasts for the whole range of exposure times, for two channels, two different flows and two imaging magnifications. As expected, the speckle contrast decreases with increasing exposure times and with increasing flows. Identical flows lead to similar speckle contrast values for both channels diameters. More unexpected, using a higher optical magnification leads to significantly higher values of the speckle contrast for the same parameters of flow, exposure, and channel diameter. Calculation of the number N of camera pixels per speckle grain image (i.e. spatial sampling of each speckle grain at the sensor) leads to values between 2.3 and 4.5, above the Nyquist sampling criteria. Following Thompson et al [24], we also calculated the ratio of the window size used for contrast calculation to the speckle size. Values of 2.4 and 1.1 were found for magnification of 2.5 and 6 respectively. The value at 2.5 is not optimal but close to the threshold advisable value. The low value at 6 magnification clearly results in underestimation the speckle contrasts due to the lack of statistics in the calculation of σ . Normalization by an experimental estimate of beta calculated over a large field of view was carried-out but did not allow to fully recover the same $K(T)$ curves for 2.5 and 6 magnifications (see supplementary Figure S3). We believe that further parameters modified by magnification like depth of field could affect the contrast [28,29]. This result needs to be further studied in our specific set-up, yet it underlines the relevance of using experimental images to train the network with data accounting for instrumental effects difficult to simulate.

3.2. Performance evaluation of MSR-Net and Res3D-Net

Table 1 summarizes the performances evaluation metrics MAE, RMSE, SSIM, PSNR and MAPE (see section 2.4) for the predicted maps using MSR-Net and Res3D-Net with respect to reference maps. For both networks the number of residual blocks B was increased from 1 to 6 and as expected, the accuracy of the network increases with the increase of B . Adding more residual blocks also increase the difficulty to achieve convergence resulting in much longer training time. Considering this tradeoff, the optimal number of residual blocks was determined to be 5 for both networks. To evaluate the statistical differences between the predictions of Res3D-Net and MSR-Net for the optimal number of residual blocks, we performed a Wilcoxon signed rank

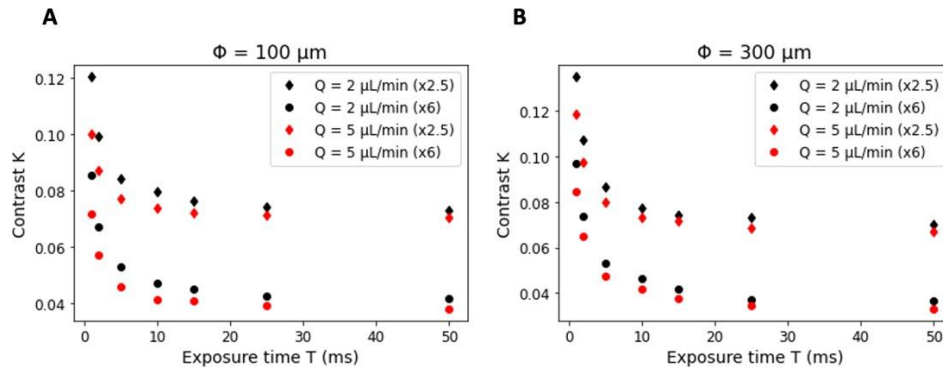


Fig. 5. Speckle contrast as a function of exposure time. A) For a channel of diameter $\Phi = 100 \mu\text{m}$ B) For a channel of diameter $\Phi = 300 \mu\text{m}$. Black symbols correspond to the $2 \mu\text{L}/\text{min}$ flow. Red symbols correspond to the $5 \mu\text{L}/\text{min}$. Diamonds correspond to the $\times 2.5$ magnification. Dots correspond to the $\times 6$ magnification.

test on the metrics from the five-fold predicted results. No significant difference was found in the predictive performance between the two networks, as indicated by p values greater than 0.05 for all metrics. However, Res3D-Net demonstrated lower levels of uncertainty in its point estimates of the metrics compared to MSR-Net, suggesting more robust predictions. As a result, the Res3D-Net approach was selected for use in subsequent experiments.

Table 1. Comparison of performances metrics for MSR-Net and Res3D-Net. The best performances for each metric are indicated in bold font. Values correspond to the mean metrics across all five sets of predicted results from five-fold cross-validation and the corresponding standard error.

Model Type	Number of residual blocks B	RMSE \pm SE	MAE \pm SE	SSIM \pm SE	PSNR \pm SE	MAPE \pm SE
MSR-Net	1	1.86 \pm 0.16	0.57 \pm 0.09	0.67 \pm 0.05	92.18 \pm 0.58	30.2% \pm 2.4%
	2	1.61 \pm 0.09	0.44 \pm 0.05	0.75 \pm 0.03	93.09 \pm 0.57	29.1% \pm 2.3%
	3	1.53 \pm 0.05	0.41 \pm 0.03	0.75 \pm 0.02	93.24 \pm 0.23	25.7% \pm 0.9%
	4	1.46 \pm 0.09	0.39 \pm 0.04	0.78 \pm 0.04	93.94 \pm 0.48	30.3% \pm 2.6%
	5	1.33 \pm 0.11	0.38 \pm 0.07	0.73 \pm 0.08	94.80 \pm 0.62	26.7% \pm 2.9%
	6	1.36 \pm 0.08	0.40 \pm 0.06	0.68 \pm 0.15	94.36 \pm 0.50	21.5% \pm 1.1%
Res3D-Net	1	1.59 \pm 0.08	0.47 \pm 0.06	0.53 \pm 0.08	93.23 \pm 0.32	27.2% \pm 1.2%
	2	1.49 \pm 0.07	0.39 \pm 0.04	0.75 \pm 0.06	93.76 \pm 0.34	27.51% \pm 1.6%
	3	1.46 \pm 0.07	0.39 \pm 0.04	0.71 \pm 0.04	93.81 \pm 0.35	28.44% \pm 1.9%
	4	1.44 \pm 0.06	0.39 \pm 0.03	0.72 \pm 0.07	93.84 \pm 0.32	27.8% \pm 2.4%
	5	1.37 \pm 0.06	0.36 \pm 0.03	0.73 \pm 0.06	94.40 \pm 0.32	24.6% \pm 0.9%
	6	1.38 \pm 0.06	0.37 \pm 0.04	0.68 \pm 0.07	94.29 \pm 0.39	24.0% \pm 1.1%

3.3. Comparison of CNN and non-linear fitting methods

Inverse correlation times maps (ICT) are derived from the non-linear fitting procedure, while the CNN produces velocity maps in mm/s units. The exact relationship between velocity and ICT is not known, though there is a proportionality relationship between both [30,31]. We have compared maps normalized to their maximum. As a representative example, Figs. 6(A) and 6(B) show a comparison between normalized velocity maps generated by CNN and normalized ICT

maps derived from pixelwise non-linear fitting at varying flow rates under two distinct optical magnifications ($\times 2.5$ and $\times 6$) for the channel of diameter $\Phi = 300 \mu\text{m}$. It is important to note that MESI data were acquired in a sub-optimal temporal sampling using a simplified acquisition scheme [11]. Especially, the minimal exposure time in the MESI data is 1 ms. This leads the non-linear fit procedure to fail to converge or to produce unrealistic extreme values for some pixels in the ICT map. To mitigate these effects, a 2D median filter (15×15) was applied to the ICT map prior to normalization. Figures 6(C) and 6(D) display the corresponding profiles within the central region (across 40 pixels) of both ICT and speed maps at a flow rate of $8 \mu\text{l}/\text{min}$. The profiles across the channel predicted from both approaches present similar shapes. However, pixelwise non-linear fitting is highly susceptible to the noise, resulting in failure to converge during the fitting process and predicting blood flow fluctuations with many extreme values. In contrast, the CNN approach incorporates information from neighboring pixels during regional feature extraction through convolutional computation, resulting in clearer dynamics (excluding extreme values) and more spatially homogeneous predictions of relative blood speed changes. Interestingly the CNN approach also reduces the edge effects (higher values of predicted speeds on the edges of the channel) due to the speckle contrast spatial processing.

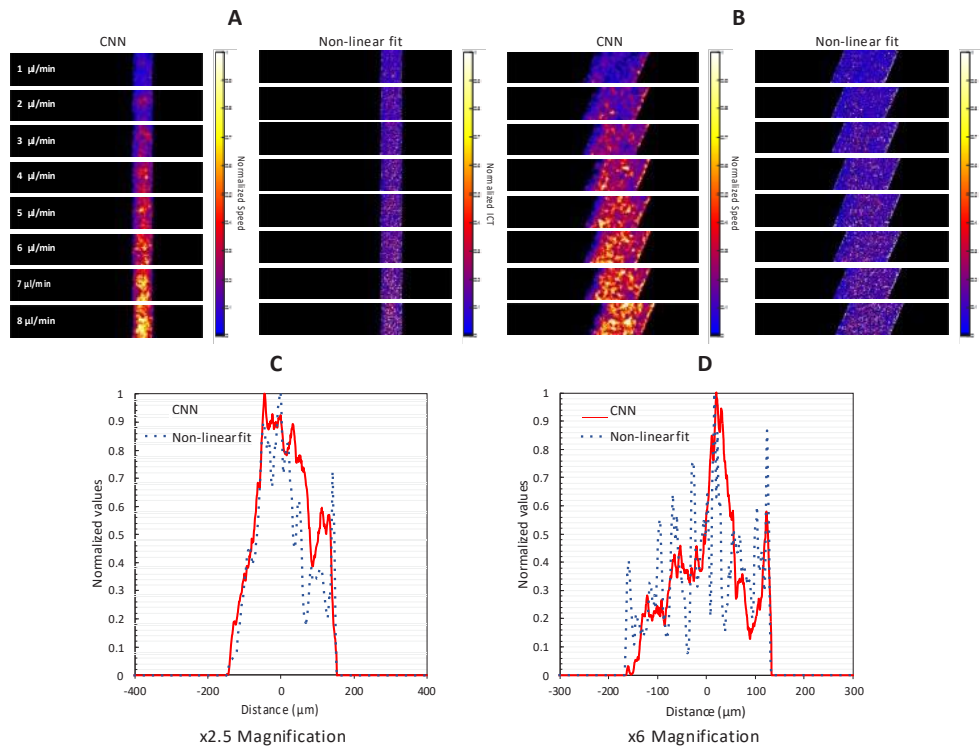


Fig. 6. Comparison of speed maps predicted by CNN and ICT maps derived from the non-linear fit under (A) $\times 2.5$ magnification and (B) $\times 6$ magnification and (C-D) their corresponding profiles extracted from both maps at a flow rate of $8 \mu\text{l}/\text{min}$. The mean speeds varied from 0.74 to $5.93 \text{ mm}/\text{s}$ (flows ranging from 1 to $8 \mu\text{l}/\text{min}$) in $0.74 \text{ mm}/\text{s}$ increments for the $\Phi = 300 \mu\text{m}$ channel.

Figure 7 shows the relative changes of Res3D-Net predicted speeds and non-linear fit ICTs as a function of the flow in channels with increasing diameter (60 , 80 , 100 and $300 \mu\text{m}$). All relative changes are normalized to a reference flow of $4.5 \mu\text{l}/\text{min}$. In all channels, the relative changes estimated either by the CNN approach or by the non-linear fit scale linearly with the actual

relative changes of the flow measured independently (by the microfluidic system inline flowmeter) in the channel. However, the CNN approach performs much better in terms of linearity, the R-square values for CNN range from 0.82 to 0.96, while those for non-linear fit range from 0.21 to 0.91. Except for smallest channel, the slope of the linear regression derived from the Res3D-Net predicted results ranges from about 0.19 to 0.23, which is very close to the slope of 0.22 for the reference flow. In contrast, non-linear fits are susceptible to noise interference, resulting in a slope range of approximately 0.09 to 0.23. In addition, the non-linear fit approach results in outliers such as the relative flow change for a 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ flow in the 80 μm channel or the relative flow change at 8 $\mu\text{l}/\text{min}$ in the 100 μm channel. Overall, Res3D-Net exhibits a higher slope than non-linear fits, indicating a broader and more robust dynamic range in response to incremental increases in flow rate. In the case of the smallest channel, the slope of the regression line from CNN-predicted results deviates from the expected values (reference flow). This deviation may be attributed to the smaller number of pixels with flow in images of small channels compared to large channels, resulting in a limited number of training patches with flow and potentially insufficient training. Future work is required to address this issue by increasing the sample size for channels with smallest dimensions.

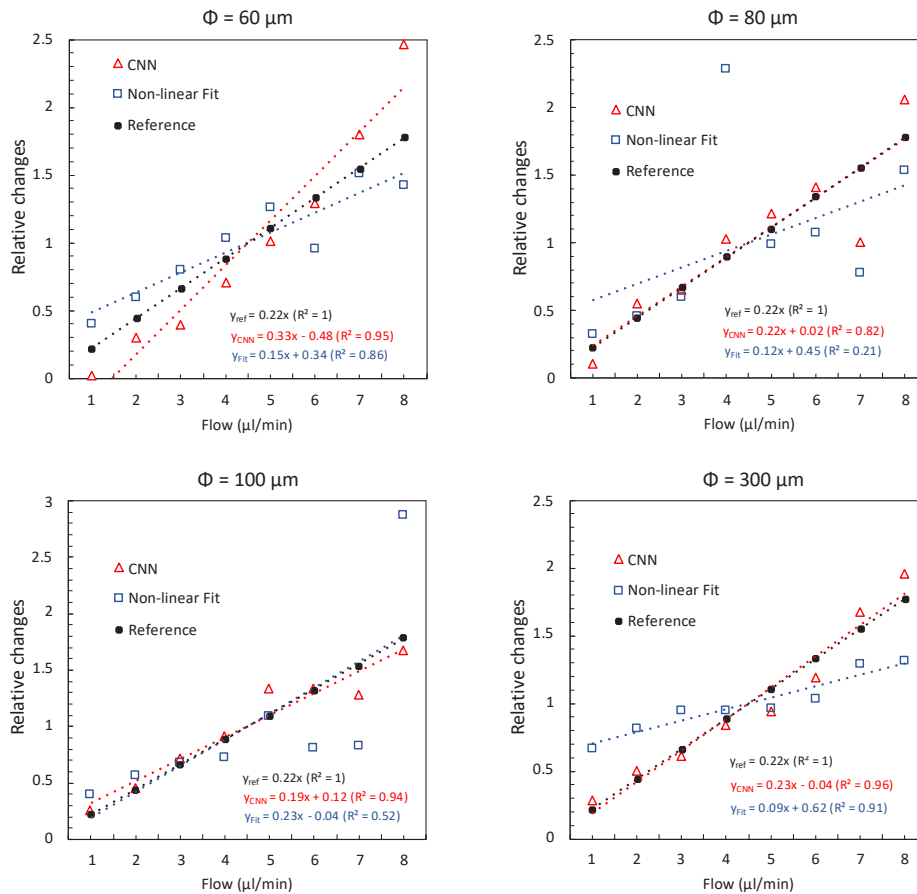


Fig. 7. Relative changes of speeds and ICTs (normalized values to flow of 4.5 $\mu\text{l}/\text{min}$) as a function of the actual flows in channels with increasing diameter (60, 80, 100 and 300 μm). Ideal reference is provided as black dots.

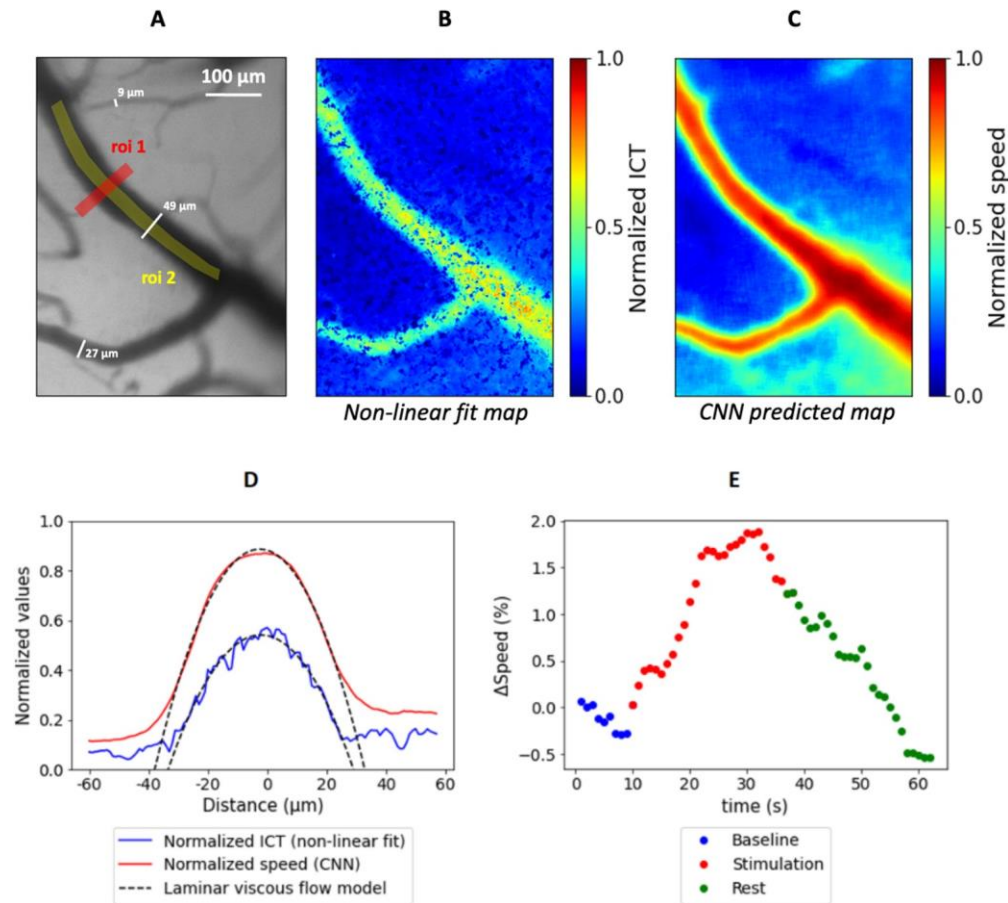


Fig. 8. Derivation of relative flow maps and changes from data obtained *in vivo* during sensory stimulation of the brain in mice. (A) Reflectance image of the MCA under green incoherent illumination at 570 nm. (B) Non-linear fit ICT map. (C) Res3D-Net predicted speed map. (D) Normalized speed/ICT profile (using ROI #1) that was applied on the CNN predicted speed map and the ICT fitted map respectively. Both profiles were fitted to the laminar viscous flow model. The center of the channel coincides with the reference 0 μm distance. (E) Time course of the relative changes in the speed during whiskers stimulation extracted from the Res3D-Net prediction maps after image processing (using ROI #2).

3.4. Implementation of CNN analysis on *in vivo* data

Multiple exposure speckle contrast images acquired *in vivo* were processed using the non-linear fit MESI model and the Res3D neural network. Figure 8(A) shows a reference image of the mouse's brain under incoherent illumination at 570 nm, where the MCA main branch is visible. The corresponding extracted ICT and Res3D-Net-derived speed maps from the same MESI data are shown on Figs. 8(B) and 8(C) respectively. On both maps, the smallest capillaries that are partly out of focus could not be analyzed but either the non-linear fit and CNN approaches. We believe that in our experimental conditions the fit failure is mostly related to the lack of data at exposure times lower than 1 ms. This minimal exposure time was chosen for synthetic exposure as a trade-off between sensitivity and amount of data required for *in vivo* dynamic studies (several 1-minute stimulation/recovery trials are recorded during a single imaging session, see Fig. 8(D)). Yet as the decorrelation times observed experimentally *in vivo* in the mice brain is mostly close or

below 1 ms [32], the decorrelation is not fully captured thus leading to possible non convergence of the model. For the analysis of these sub-optimal MESI data, the CNN derived map shows a larger dynamic of speed values compared to the non-linear fit derived ICT map. In addition, it presents homogeneous values in neighboring pixels while the ICT map presents some null values corresponding to pixels where the non-linear fitting model did not converge.

The region of interest ROI#1 on Fig. 8(A) was used to derive the profile of the normalized ICT and speed derived from Fig. 8(B) and 8(C) respectively. Figure 8(D) shows the corresponding profiles in plain lines. A parabolic profile fits the data very well in both cases (dashed lines). This corresponds to the laminar viscous flow following Poiseuille's law in a cylinder-shaped channel, thus validating the choice of this model to define the target images for the training of the network. The profiles demonstrate again higher dynamics and lower noise in the map derived using the Res3D-Net approach compared to the non-linear fit approach.

The region of interest ROI#2 on Fig. 8(A) was used to derive the time course of the relative changes of the speed during a single short sensory stimulation trial showed on Fig. 8(D). An increase of the blood speed of around +2% is detected during the stimulation relatively to the baseline mean value indicating a functional activation of the underlying somatosensory cortex. This increase of blood speed is followed by a decay back to the baseline value once the stimulation ceases.

4. Discussion

In this work, we have proposed a novel CNN-based approach as an alternative to conventional non-linear algorithms to process MESI data to extract relative flow-speed changes. The method relies on a 3D CNN (Res3D-Net) end-to-end neural network for MESI, which is capable of mapping blood flow with better image contrast and signal-to noise ratio (SNR) comparing to existing algorithms.

4.1. Benefit and limits of real experimental data for network training

We have trained the CNN using speckle contrast images of flows in microfluidic channels obtained experimentally with the same MESI imaging set-up that was used to acquire *in vivo* speckle contrasts images to be analyzed by the neural network for blood flow estimations. In comparison to training based on simulated speckle contrast images, the experimental training database has the advantage of incorporating all the instrumental and experimental parameters that are very difficult to accurately account for in simulations. Indeed, it has been demonstrated that the experimental speckle contrast values are strongly affected by many experimental parameters, some of which are difficult to evaluate. This includes the spatial sampling of the speckle grain at the sensor level defined by the camera magnification, pixel dimensions of the sensor and the numerical aperture of optics [33], the laser source coherence length [34], polarization, and angle of incidence [4], the illumination intensity and distribution, the camera dynamics and pixel well-depth, the camera readout and dark noise (including fixed patterns noise) [35]. Here, the use of microfluidic phantoms with controlled flows obtained through pressure control and on-line feedback allowed to create target images with accurate flow values for network training. Care was also taken to train the network with images obtained on channels with dimensions and flows representative of the mouse brain physiology, which was not achieved in previous attempts at using machine learning for speckle imaging analysis [14,19]. Using experimental data to train the network has also limits compared to simulations. Practically, MESI data can be acquired for a finite number of experimental situations, thus not all possible diameters and flows within the physiological range were used. However, the analysis of *in vivo* data shows that the Res3D-Net was able to infer relevant values for blood vessels whose exact diameter and flows had not been presented to the network in the training phase (see Fig. 8 and supplemental Figure S4). We hypothesize that the network can interpolate for data in the range parameters of the data

presented in the training phase. Further work is requested to investigate this issue and how the network would perform for data with parameters far from the range of those used in the training phase. Using simulated data has the intrinsic advantage of providing large amount of data for a vast range of parameters. Whether using experimental or simulated data is better to train CNN networks in the context of LSCI or MESI imaging remains an open question.

4.2. Comparison of MSR-Net and Res3D-Net

In this study, we proposed two networks for predicting blood flow distribution. The MSR-Net primarily predicts blood flow distribution based on the extracting speckle features independently at different exposure times. In contrast, the Res3D-Net performs convolution with 3D kernels, allowing it to extract features that simultaneously contain speckles and their correlations at different exposure times. Since the MESI model is based on the changes in K values at different exposure times, 3D feature extraction of the Res3D-Net is inherently closer to the assumptions of the MESI model. Despite this, our microfluidic experiments showed that both the MSR-Net and Res3D-Net were capable of accurately predicting blood flow. However, when performing five-fold cross-validation, the five sets of data predicted by the Res3D-Net exhibited less variation. Less variation in network prediction indicates a reduced likelihood of overfitting and improved generalization ability. We speculate that this may be due to the Res3D-Net's closer alignment with the assumptions of the MESI model, making it easier to identify correlations between input speckle images and blood flow distribution during training. It is worth noting that previous work used ANN methods to establish the relationship between changes in K values at different exposure times and flow velocity using simulated data [12]. However, in our study, our CNN architecture further incorporates spatial information from speckle images. By considering spatial information, one can better avoid convergence failure or extreme values that may arise when predicting on a pixelwise basis.

4.3. Comparison of CNN and non-linear fitting approaches

The comparison of the blood flow maps derived using the CNN approach and non-linear fitting approach shows similar distribution of the relative blood flows. In addition, the machine learning approach has several advantages compared to the model fitting approach applied to the MESI data obtained using synthetic exposure with a sCMOS camera. First, it does not require computationally intensive pixelwise fitting. In fact, processing a 700x700 pixels image with the Res3D-Net takes around 400 ms, reducing the processing time by a factor of 3115 compared to non-linear fitting in a python implementation using the same computer hardware configuration (see supplementary Figure S1). Indeed, CNN computation time falls below 1 s starting from 3 used cores which obviates the need of a complex hardware configuration to perform the necessary calculations. Consequently, this improvement paves the way for real-time MESI analysis. Second, the pixelwise non-linear fitting model is sensitive to data noise and to the choice of the initial parameters of the fit. Therefore, for multiple exposure data with suboptimal time sampling at the early times of decorrelation, the fit does not converge for all pixels leading to the need of defining large ROIs to average neighboring pixels contrast values. Contrarily, the CNN derived blood flow maps show consistent and homogeneous relative flow values for neighboring pixels. Third, the CNN approach does not rely on *a priori* model of how speckle contrast is related to the decorrelation time. Indeed, in the non-linear fitting approach, the model is most generally founded on the assumption of an exponential decay of the decorrelation function of the field $g_1(t)$, assuming that the flow regime is either single scattering un-ordered (SU) or multiple scattering ordered (MO). However, using a very high frame rate camera (>20kHz) to calculate experimentally $g_1(t)$ for each pixel of the exposed brain of a mouse, it was shown that various mixed flow regimes co-exist including multiple scattering unordered flow (MU) for capillaries and parenchyma or single scattering ordered flow (SO) for large vessels [32]. These findings are

meaningful from a physiological point of view, since the flow regimes in arterioles, capillaries or the parenchyma are different. Consequently, the fitting function should be adapted for each pixel of the field of view considering the local flow regime. Changing the fitting functions applied to the experimental data ultimately leads to different estimations of the decorrelation time τ_c . Practically, as a single fitting function for all pixels must be set in advance, a trade-off is made, leading to significant errors in the estimations of the flow. Alternatively, a model free approach for speckle data analysis based on a new definition of the speckle contrast was recently proposed and validated provided that the ergodicity condition is satisfied [36]. This assumption is not true when static scatterers contribute significantly to the speckle contrast and the method is no longer model-free as it requires the introduction of a parameter to characterize the stiffness of $g_1(t)$ decrease. The CNN machine learning approach proposed here is totally model-free by nature and is likely to encompass the complexity of speckle contrast formation through training with experimental data to adjust the network weights. As also supported by a recent study for *in vitro* data acquired for a rotating disk covered with a diffusive paint [19], a carefully trained CNN network with accurately sampled MESI data is likely to predict quantitative velocities

Funding. Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Ph-D Scholarship (M Chammas) ED EOBE); Campus France (PHC-ORCHID MESI-ML); National Science and Technology Council (Grant No. 112-2927-1-182-502, PHC-ORCHID MESI-ML); Chang Gung Memorial Hospital, Linkou (Project No. BMRP14).

Acknowledgments. We gratefully thank Christophe Hecquet for help with MESI instrument hardware and Mondher Besbes for helpful support on computational hardware in Laboratoire Charles Fabry.

Disclosures. The authors declare that there are no conflicts of interest related to this article.

Data availability. Data underlying the results may be obtained from the authors upon reasonable request. Experimental dataset of speckle contrast images used in this paper are available in an open institutional data repository Rech Data Gouv in [Dataset 1](#) Ref. [23].

Supplemental document. See [Supplement 1](#) for supporting content.

References

1. W. Heeman, W. Steenbergen, G. van Dam, and E. C. Boerma, "Clinical applications of laser speckle contrast imaging: a review," *J. Biomed. Opt.* **24**(08), 1–11 (2019).
2. A. F. Fercher and J. D. Briers, "Flow visualization by means of single-exposure speckle photography," *Opt. Commun.* **37**(5), 326–330 (1981).
3. J. W. Goodman, "Statistical properties of laser speckle patterns," in *Laser Speckle and Related Phenomena*, Topics in Applied Physics (Springer, 1975), pp. 9–75.
4. P. G. Vaz, A. Humeau-Heurtier, E. Figueiras, C. Correia, and J. Cardoso, "Laser speckle imaging to monitor microvascular blood flow: a review," *IEEE Rev. Biomed. Eng.* **9**, 106–120 (2016).
5. D. A. Boas and A. K. Dunn, "Laser speckle contrast imaging in biomedical optics," *J. Biomed. Opt.* **15**(1), 011109 (2010).
6. A. B. Parthasarathy, S. M. S. Kazmi, and A. K. Dunn, "Quantitative imaging of ischemic stroke through thinned skull in mice with Multi Exposure Speckle Imaging," *Biomed. Opt. Express* **1**(1), 246–259 (2010).
7. S. M. S. Kazmi, E. Faraji, M. A. Davis, Y.-Y. Huang, X. J. Zhang, and A. K. Dunn, "Flux or speed? Examining speckle contrast imaging of vascular flows," *Biomed. Opt. Express* **6**(7), 2588–2608 (2015).
8. S. Sun, B. R. Hayes-Gill, D. He, Y. Zhu, and S. P. Morgan, "Multi-exposure laser speckle contrast imaging using a high frame rate CMOS sensor with a field programmable gate array," *Opt. Lett.* **40**(20), 4587–4590 (2015).
9. H. Soleimanzad, F. Smekens, J. Peyronnet, M. Juchaux, O. Lefebvre, D. Bouville, C. Magnan, H. Gurden, and F. Pain, "Multiple speckle exposure imaging for the study of blood flow changes induced by functional activation of barrel cortex and olfactory bulb in mice," *Neurophotonics* **6**(01), 1 (2019).
10. M. Hultman, I. Fredriksson, M. Larsson, A. Alvandpour, and T. Strömberg, "A 15.6 frames per second 1-megapixel multiple exposure laser speckle contrast imaging setup," *J. Biophotonics* **11**(2), e201700069 (2018).
11. M. Chammas and F. Pain, "Synthetic exposure with a CMOS camera for multiple exposure speckle imaging of blood flow," *Sci. Rep.* **12**(1), 4708 (2022).
12. I. Fredriksson, M. Hultman, T. Strömberg, and M. Larsson, "Machine learning in multiexposure laser speckle contrast imaging can replace conventional laser Doppler flowmetry," *J. Biomed. Opt.* **24**(01), 1–11 (2019).
13. M. Hultman, M. Larsson, T. Strömberg, J. Henricson, F. Iredahl, and I. Fredriksson, "Flowmotion imaging analysis of spatiotemporal variations in skin microcirculatory perfusion," *Microvasc. Res.* **146**, 104456 (2023).
14. I. Stebakov, E. Kornaeva, D. Stavtsev, E. Potapova, and V. Dremmin, "Laser speckle contrast imaging and machine learning in application to physiological fluids flow rate recognition," *Vib. proced.* **38**, 50–55 (2021).

15. H. Yu, L. T. Yang, Q. Zhang, D. Armstrong, and M. J. Deen, "Convolutional neural networks for medical image analysis: State-of-the-art, comparisons, improvement and perspectives," *Neurocomputing* **444**, 92–110 (2021).
16. S. Kaji and S. Kida, "Overview of image-to-image translation by use of deep neural networks: denoising, super-resolution, modality conversion, and reconstruction in medical imaging," *Radiol. Phys. Technol.* **12**(3), 235–248 (2019).
17. T. L. Bobrow, F. Mahmood, M. Inserni, and N. J. Durr, "DeepLSR: a deep learning approach for laser speckle reduction," *Biomed. Opt. Express* **10**(6), 2869–2882 (2019).
18. W. Cheng, J. Lu, X. Zhu, J. Hong, X. Liu, M. Li, and P. Li, "Dilated residual learning with skip connections for real-time denoising of laser speckle imaging of blood flow in a log-transformed domain," *IEEE Trans. Med. Imaging* **39**(5), 1582–1593 (2020).
19. X. Hao, S. Wu, L. Lin, Y. Chen, S. P. Morgan, and S. Sun, "A quantitative laser speckle-based velocity prediction approach using machine learning," *Opt. Lasers Eng.* **166**, 107587 (2023).
20. R. Michels, F. Foschum, and A. Kienle, "Optical properties of fat emulsions," *Opt. Express* **16**(8), 5907–5925 (2008).
21. A. Roggan, M. Friebel, K. Doerschel, A. Hahn, and G. J. Mueller, "Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400–2500 nm," *J. Biomed. Opt.* **4**(1), 36–46 (1999).
22. E. Chaigneau, M. Oheim, E. Audinat, and S. Charpak, "Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**(22), 13081–13086 (2003).
23. F. Pain and M. Chammas, "Multiple exposure speckle imaging contrast database obtained in vitro on microfluidic chips for various exposure, channel width, flows and optical magnification," *Recherche Data Gov* (2023) <https://doi.org/10.57745/KHGHTO>.
24. O. Thompson, M. Andrews, and E. Hirst, "Correction for spatial averaging in laser speckle contrast analysis," *Biomed. Opt. Express* **2**(4), 1021–1029 (2011).
25. K. He, X. Zhang, S. Ren, and J. Sun, "Identity Mappings in Deep Residual Networks," in *Computer Vision – ECCV 2016*, B. Leibe, J. Matas, N. Sebe, and M. Welling, eds., Lecture Notes in Computer Science (Springer International Publishing, 2016), pp. 630–645.
26. P. Refaiehzadeh, L. Tang, and H. Liu, "Cross-Validation," in *Encyclopedia of Database Systems*, L. Liu and M. T. Özsu, eds. (Springer US, 2009), pp. 532–538.
27. Z. Wang, A. C. Bovik, H. R. Sheikh, and E. P. Simoncelli, "Image quality assessment: from error visibility to structural similarity," *IEEE Trans. on Image Process.* **13**(4), 600–612 (2004).
28. I. Sigal, R. Gad, A. M. Caravaca-Aguirre, Y. Atchia, D. B. Conkey, R. Piestun, and O. Levi, "Laser speckle contrast imaging with extended depth of field for in-vivo tissue imaging," *Biomed. Opt. Express* **5**(1), 123–135 (2014).
29. S. Zheng, S. Xiao, L. Kretsge, A. Cruz-Martin, and J. Mertz, "Depth resolution in multifocus laser speckle contrast imaging," *Opt. Lett.* **46**(19), 5059–5062 (2021).
30. J. D. Briers and S. Webster, "Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow," *J. Biomed. Opt.* **1**(2), 174–179 (1996).
31. D. D. Duncan and S. J. Kirkpatrick, "Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool?" *J. Opt. Soc. Am. A* **25**(8), 2088–2094 (2008).
32. D. D. Postnov, J. Tang, S. E. Erdener, K. Kılıç, and D. A. Boas, "Dynamic light scattering imaging," *Sci. Adv.* **6**(45), eabc4628 (2020).
33. S. J. Kirkpatrick, D. D. Duncan, and E. M. Wells-Gray, "Detrimental effects of speckle-pixel size matching in laser speckle contrast imaging," *Opt. Lett.* **33**(24), 2886–2888 (2008).
34. D. D. Postnov, X. Cheng, S. E. Erdener, and D. A. Boas, "Choosing a laser for laser speckle contrast imaging," *Sci. Rep.* **9**(1), 2542 (2019).
35. C. P. Valdes, H. M. Varma, A. K. Kristoffersen, T. Dragojevic, J. P. Culver, and T. Durduran, "Speckle contrast optical spectroscopy, a non-invasive, diffuse optical method for measuring microvascular blood flow in tissue," *Biomed. Opt. Express* **5**(8), 2769–2784 (2014).
36. S. Zheng and J. Mertz, "Direct characterization of tissue dynamics with laser speckle contrast imaging," *Biomed. Opt. Express* **13**(8), 4118–4133 (2022).