

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CONSTRUCTION D'UN ATLAS DE LA MICROSTRUCTURE DE LA MATIÈRE  
BLANCHE DE LA MOELLE ÉPINIÈRE CHEZ LE RAT À PARTIR D'ACQUISITIONS  
HISTOLOGIQUES

ARIANE SALIANI

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2017

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

CONSTRUCTION D'UN ATLAS DE LA MICROSTRUCTURE DE LA MATIÈRE  
BLANCHE DE LA MOELLE ÉPINIÈRE CHEZ LE RAT À PARTIR D'ACQUISITIONS  
HISTOLOGIQUES

présenté par: SALIANI Ariane

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. SAWAN Mohamad, Ph. D, président

M. COHEN-ADAD Julien, Ph. D, membre et directeur de recherche

M. STIKOV Nikola, Ph. D, membre et codirecteur de recherche

M. LEBLOND Frédéric, Ph. D, membre

## DÉDICACE

*À Quentin, maman, papa et Armand.*

*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! »*

*Albert Einstein, (1879 - 1955)*

## REMERCIEMENTS

Ce sont avec les remerciements que je commence la rédaction de mon mémoire. Ces deux années de maîtrise furent très formatrices. En effet, avant de commencer ma maîtrise recherche à Polytechnique Montréal, j'ai fait mes études d'ingénieur en France, et durant ces études les étudiants sont encadrés de près par leurs professeurs. A Neuropoly, il faut apprendre à être autonome et cette autonomie, qui me manquait, je l'ai apprise ici, par la force des choses. Ce fut un exercice difficile à intégrer mais que j'ai réussi à réaliser. Je suis fière du travail que j'ai accompli, du projet que j'ai mené à bien et des compétences qui me manquaient et que j'ai acquises durant ces deux années.

Julien Cohen-Adad et Nikola Stikov, les superviseurs de ma maîtrise, ont été des professeurs très complémentaires. Julien est sans hésiter le plus exigeant et le plus pointilleux et Nikola le plus patient et complaisant. Mais combinés ensemble, ces deux forces permettent de cultiver une vraie dynamique au sein du laboratoire et permettent aux étudiants de se surpasser et d'acquérir de nouvelles compétences.

C'est pourquoi je leur suis infiniment reconnaissante de tout ce qu'ils m'ont apporté et les remercie de la bienveillance et de la confiance qu'ils m'ont accordées.

De plus, ma maîtrise aurait été différente sans l'amitié de Tanguy Duval, Aldo Zaimi, Atef Badji, Benjamin De Leener, Gabriel Mangeat, Manh Tung Vuong, Alexandre Popov, Charley Gros, Maxime Wabarta Christian Serre.

Je tiens à remercier plus particulièrement Tanguy et Aldo avec qui j'ai travaillé sur nos différents projets et avec qui j'ai passé de très bons moments. Ce fut un réel plaisir de travailler à leur côté et c'est un honneur d'être leur amie.

Je remercie également le lab du CM2, où j'ai pu réaliser mes acquisitions au microscope électronique à balayage sous l'œil formateur de Nicole McDonald et de Philippe Plamondon.

Je n'oublie pas non plus Amal Bennani qui fut d'une grande aide pour tout ce qui était relatif à l'administration.

Je remercie le président Mohamad Sawan et les membres du jury, Julien Cohen-Adad, Nikola Stikov et Frédéric Leblond pour le temps qu'ils consacreront à la lecture de ce mémoire et de l'intérêt qu'ils y porteront.

## RÉSUMÉ

Les maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaques multiple affectent les axones de la matière blanche de la moelle épinière et plus précisément induisent une perte de la gaine de myéline qui entoure les axones. Pour pouvoir quantifier cette perte de myéline, il est nécessaire de réaliser des études histologiques de la matière blanche de la moelle épinière pour connaître, à chaque niveau vertébral, les informations sur la microstructure des différents tractus de la matière blanche telles que le diamètre axonal, la densité axonale, l'épaisseur de la gaine de myéline et le g-ratio (ratio du diamètre interne de la fibre myélinisée sur son diamètre externe).

Les objectifs du projet de recherche sont de fournir le premier atlas de la matière blanche chez le rat construit à partir d'images histologiques *ex vivo*, à haute résolution, acquises le long de toutes les vertèbres et de les mettre en libre accès.

Pour réaliser cette cartographie de la matière blanche de la moelle épinière chez le rat, nous avons optimisé les protocoles histologiques de routine de la matière blanche et utilisé une méthode d'acquisition au microscope électronique à balayage automatique pour pouvoir avoir les coupes de moelle complètes. Puis nous avons utilisé un logiciel de segmentation automatique AxonSeg pour avoir accès aux informations de chaque axone (diamètre, densité ...) et développé une méthode pour moyenner les cartes histologiques entre chaque coupe histologique de même niveau vertébral et entre chaque rat et extraire ainsi les statistiques de ces cartes moyennées.

Les résultats montrent un diamètre axonal moyen au niveau cervical pour les tracts fasciculus cuneatus, fasciculus gracilis, dorsal corticospinal, rubrospinal, réticulospinal, et vestibular respectivement de  $2.12 \pm 0.25 \mu\text{m}$ ,  $2.12 \pm 0.14 \mu\text{m}$ ,  $1.46 \pm 0.11 \mu\text{m}$ ,  $1.92 \pm 0.26 \mu\text{m}$ ,  $2.01 \pm 0.15 \mu\text{m}$  et  $2.43 \pm 0.24 \mu\text{m}$ . Pour le niveau thoracique :  $1.99 \pm 0.19 \mu\text{m}$ ,  $1.89 \pm 0.14 \mu\text{m}$ ,  $1.48 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ,  $1.98 \pm 0.28 \mu\text{m}$ ,  $1.98 \pm 0.17 \mu\text{m}$  et  $2.37 \pm 0.20 \mu\text{m}$ . Pour le niveau lombaire :  $1.89 \pm 0.25 \mu\text{m}$ ,  $1.99 \pm 0.18 \mu\text{m}$ ,  $1.48 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ,  $1.66 \pm 0.18 \mu\text{m}$ ,  $1.88 \pm 0.09 \mu\text{m}$  et  $2.15 \pm 0.21 \mu\text{m}$ . Pour le niveau sacré :  $1.88 \pm 0.29 \mu\text{m}$ ,  $1.87 \pm 0.20 \mu\text{m}$ ,  $1.41 \pm 0.07 \mu\text{m}$ ,  $1.53 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ,  $1.84 \pm 0.10 \mu\text{m}$  et  $2.09 \pm 0.22 \mu\text{m}$ . Ces valeurs sont similaires sur les moitiés droite et à gauche de la matière blanche.

Cette étude montre pour la première fois une cartographie *ex vivo* du diamètre axonal (et d'autres métriques) de la matière blanche de la moelle épinière chez le rat le long des niveaux vertébraux, créant ainsi des opportunités pour des applications dans les maladies affectant la moelle épinière.

## ABSTRACT

Target clinical applications multiple sclerosis and a range of other neurological conditions. Many neurological diseases have hallmark histopathology such as neuronal loss, axonal degeneration, which can affect image intensities in different ways potentially allowing microstructure imaging techniques to detect them and grade their severity. Indeed, the ability to characterize the white matter microstructure has important applications in the understanding of neurodegenerative diseases.

To quantify these hallmark histopathology, there is a need to know the white matter microstructural information such as axon diameter, axon density, myelin thickness, and g-ratio.

This project proposes a method for a previously unaddressed problem, namely, mapping axon diameter (and other metrics) across vertebral levels, tracts and rats, using histology. We have develop a digital atlas of the adult rat spinal cords as a comprehensive framework for storing and accessing the myriad types of information about the rat spinal cord. This study shows for the first time ex vivo mapping of axon diameter, axon density, myelin thickness and g-ratio, in the white matter spinal cord across vertebral levels.

In this study, (i) we acquire rat spinal cord (C1-S2) using scanning electron microscopy, (ii) measure microstructure metrics using axon and myelin segmentation, (iii) create maps of averaged metrics across rats, (iv) compute statistics within specific tracts and (v) Study the variability of axon morphology across rats, vertebral levels and tracts.

Results show an average axon diameter for the fasciculus cuneatus, fasciculus gracilis, dorsal corticospinal, rubrospinal, reticulospinal, and vestibular tracts respectively in cervical level of  $2.12 \pm 0.25 \mu\text{m}$ ,  $2.12 \pm 0.14 \mu\text{m}$ ,  $1.46 \pm 0.11 \mu\text{m}$ ,  $1.92 \pm 0.26 \mu\text{m}$ ,  $2.01 \pm 0.15 \mu\text{m}$  and  $2.43 \pm 0.24 \mu\text{m}$ . In thoracic level:  $1.99 \pm 0.19 \mu\text{m}$ ,  $1.89 \pm 0.14 \mu\text{m}$ ,  $1.48 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ,  $1.98 \pm 0.28 \mu\text{m}$ ,  $1.98 \pm 0.17 \mu\text{m}$  and  $2.37 \pm 0.20 \mu\text{m}$ . In lumbar level:  $1.89 \pm 0.25 \mu\text{m}$ ,  $1.99 \pm 0.18 \mu\text{m}$ ,  $1.48 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ,  $1.66 \pm 0.18 \mu\text{m}$ ,  $1.88 \pm 0.09 \mu\text{m}$  and  $2.15 \pm 0.21 \mu\text{m}$ . In sacral level:  $1.88 \pm 0.29 \mu\text{m}$ ,  $1.87 \pm 0.20 \mu\text{m}$ ,  $1.41 \pm 0.07 \mu\text{m}$ ,  $1.53 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ,  $1.84 \pm 0.10 \mu\text{m}$  and  $2.09 \pm 0.22 \mu\text{m}$ . Values are similar across laterality (left-right).

This atlas would create opportunities for applications in spinal cord diseases. Indeed, atlases are an invaluable aid in understanding the impact of such manipulations by providing a standard for comparison.

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE .....	III
REMERCIEMENTS.....	IV
RÉSUMÉ .....	V
ABSTRACT.....	VI
TABLE DES MATIÈRES .....	VIII
LISTE DES TABLEAUX .....	XIII
LISTE DES FIGURES .....	XVI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XX
LISTE DES ANNEXES .....	XXI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION .....	1
1.1 Contexte de la recherche .....	1
1.2 Motivations .....	2
1.3 Objectifs .....	3
1.3.1 Objectifs généraux .....	3
1.3.2 Objectifs spécifiques .....	3
1.4 Hypothèses scientifiques .....	4
1.5 Publications .....	4
1.6 Organisation du présent mémoire .....	5
CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE.....	7
2.1 La moelle épinière chez les vertébrés .....	7
2.1.1 Anatomie .....	7
2.1.2 La matière grise .....	8
2.1.3 La matière blanche .....	10



2.1.4	Le neurone.....	14
2.1.5	Le processus de myélinisation .....	15
2.2	Histologie de la matière blanche .....	17
2.2.1	Préparation du tissu .....	17
2.2.1.1	Protocoles de fixation.....	18
2.2.1.2	Coloration du tissu .....	24
2.2.1.3	Déshydratation du tissu .....	25
2.2.1.4	Enrobage du tissu .....	25
2.2.2	Microscopie.....	26
2.2.2.1	Microscopie optique (MO).....	26
2.2.2.2	Microscopie électronique (ME) .....	29
2.2.3	Mesures morphologiques des fibres nerveuses dans la littérature .....	32
2.2.3.1	Axones myélinisés et non myélinisés .....	33
2.2.3.2	Diamètre axonal .....	33
2.2.3.3	Densité axonale .....	35
2.2.3.4	Épaisseur de la gaine de myéline .....	36
2.2.3.5	G-ratio .....	37
2.2.3.6	Sources de variabilité .....	37
2.3	Génération d'atlas de la matière blanche de la moelle épinière .....	40
2.3.1	Méthodologie .....	40
2.3.2	Atlas existants .....	41
2.3.3	Les atlas de la matière blanche chez le rat .....	41
2.4	Originalité du projet de maîtrise .....	42
2.4.1	Peu d'informations sur la microstructure des tracts .....	42

2.4.2	Difficulté à déterminer les tracts de la matière blanche .....	43
<b>CHAPITRE 3 MATÉRIAUX ET MÉTHODES .....</b>		<b>44</b>
3.1	Modèles de rat .....	44
3.2	Protocoles d'histologie .....	44
3.2.1	Aperçu général .....	44
3.2.2	Préparation des tissus .....	46
3.2.3	Polissage des échantillons .....	47
3.3	Protocole d'acquisition au microscope électronique à balayage (MEB) .....	47
3.3.1	Caractéristiques générales .....	47
3.3.2	Paramètres d'acquisition .....	48
3.3.2.1	Détecteurs .....	48
3.3.2.2	Tension d'accélération .....	49
3.3.2.3	Sonde de courant .....	49
3.3.2.4	Distance de travail .....	50
3.3.2.5	Ouverture du diaphragme .....	50
3.3.2.6	Profondeur de champ .....	51
3.4	Traitement des données .....	51
3.4.1	Aperçu général .....	51
3.4.2	Assemblage panoramique de la mosaïque .....	54
3.4.3	Identification des niveaux vertébraux .....	54
3.4.4	Segmentation .....	57
3.4.4.1	Paramètres de segmentation .....	58
3.4.4.2	Validation .....	59
3.4.5	Sous-échantillonnage .....	60

3.4.6	Comparaison des protocoles histologiques .....	61
3.4.7	Construction de l'atlas : Génération de cartes moyennes des métriques morphologiques.....	63
3.4.8	Analyse par tractus .....	64
3.4.8.1	Recalage de l'atlas de référence sur l'image histologique .....	64
3.4.8.2	Statistiques .....	66
CHAPITRE 4	RÉSULTATS .....	68
4.1	Données de microscopie brutes.....	68
4.2	Validation de la segmentation.....	69
4.3	Identification des niveaux vertébraux par reconnaissance de forme .....	70
4.4	Cartes moyennes de la microstructure chez le rat .....	71
4.4.1	Diamètre axonal .....	72
4.4.2	Densité axonale .....	73
4.4.3	G-ratio .....	74
4.5	Analyse par tractus .....	75
4.5.1	Diamètre axonal .....	75
4.5.2	Densité axonale .....	79
4.5.3	Épaisseur de la gaine de myéline .....	84
4.5.4	G-ratio .....	88
4.6	Étude de la variabilité le long des niveaux vertébraux.....	91
4.6.1	Étude de la variabilité entre les niveaux C, T, L et S moyennés.....	91
4.6.2	Étude de la variabilité gauche/droite.....	94
4.6.2.1	Diamètre axonal .....	94
4.6.2.2	Densité axonale .....	96
4.6.2.3	Épaisseur de la gaine de myéline .....	99

4.6.2.4	G-ratio .....	101
CHAPITRE 5 DISCUSSION DES RÉSULTATS.....		103
5.1	Préparation du tissu : Artéfacts de fixation .....	103
5.2	Acquisition au MEB.....	104
5.3	Identification des niveaux vertébraux .....	104
5.4	Traitement des données .....	105
5.4.1	Segmentation automatique par le logiciel AxonSeg .....	105
5.4.2	Recalage des cartes moyennées entre rats sur l’atlas de référence .....	105
5.5	Création de l’atlas de la matière blanche .....	106
5.5.1	Difficulté à déterminer les tracts de la matière blanche .....	106
5.5.2	Choix de l’atlas de référence.....	106
5.6	Interprétation des cartes .....	107
5.6.1	Variabilité inter-rat.....	107
5.6.2	Analyse tractus par tractus .....	107
5.6.3	Variabilité entre niveaux vertébraux.....	108
5.6.4	Comparaisons avec la littérature .....	109
5.7	Directions futures .....	110
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....		111
6.1	Contributions au projet de recherche à l’avancement des connaissances .....	111
6.2	Applications .....	111
6.3	Recommandations .....	111
BIBLIOGRAPHIE.....		113
ANNEXES .....		127

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Fonctions des différents tracts de la matière blanche. ....	12
Tableau 2-2 : Les différents protocoles histologiques trouvés dans la littérature pour différentes espèces.....	21
Tableau 2-3 : Les différents types de solutions tampons pour les études histologiques. ....	22
Tableau 2-4 : Comparaison des différentes techniques d'imagerie de la microstructure de la matière blanche de la moelle épinière. ....	31
Tableau 2-5 : Valeurs de diamètre axonal dans la matière blanche de moelle épinière chez le rat dans les tracts dorsal corticospinal (dCST), fasciculus gracilis (FG), fasciculus cuneatis (FC), Reticulospinal (ReST), rubrospinal (RST), spinothalamic (STT), vestibulospinal (VST). ...	34
Tableau 2-6 : Valeurs de densité axonale dans la matière blanche de moelle épinière chez le rat dans les tracts dorsal corticospinal (dCST), fasciculus gracilis (FG), fasciculus cuneatis (FC), Reticulospinal (ReST), rubrospinal (RST), vestibulospinal (VST). ....	36
Tableau 2-7 : Valeurs de l'épaisseur de la gaine de myéline dans la matière blanche de moelle épinière chez le rat. Tract dorsal corticospinal (dCST), fasciculus gracilis (FG), rubrospinal (RST), vestibulospinal (VST). ....	36
Tableau 3-1 : Les différents protocoles de fixation utilisés. ....	45
Tableau 3-2 : Protocoles de préparation des solutions de résine époxy.....	46
Tableau 3-3 : Caractéristiques du microscope JEOL JSM7600F .....	48
Tableau 3-4 : Paramètres d'acquisition du MEB utilisés pour ce projet de recherche. ....	51
Tableau 4-1 : Résultats de la validation de la segmentation par AxonSeg. ....	69
Tableau 4-2 : Diamètre axonal moyen le long des vertèbres cervicales. ....	75
Tableau 4-3 : Écart type du diamètre axonal moyen le long des vertèbres cervicales.....	76
Tableau 4-4 : Diamètre axonal moyen le long des vertèbres thoraciques.....	76
Tableau 4-5 : Écart type du diamètre axonal moyen le long des vertèbres thoraciques. ....	77

Tableau 4-6 : Diamètre axonal moyen (à gauche) et écart type du diamètre axonal moyen (à droite) le long des vertèbres lombaires. ....	77
Tableau 4-7 : Diamètre axonal moyen (à gauche) et écart type du diamètre axonal moyen (à droite) du le long des vertèbres sacrales. ....	78
Tableau 4-8 : Densité axonale moyenne le long des vertèbres cervicales. ....	80
Tableau 4-9 : Écart type de la densité axonale moyenne le long des vertèbres cervicales. ....	80
Tableau 4-10 : Densité axonale moyenne le long des vertèbres thoraciques. ....	81
Tableau 4-11 : Écart type de la densité axonale moyenne le long des vertèbres thoraciques. ....	81
Tableau 4-12 : Densité axonale moyenne (à gauche) et écart type de la densité axonale moyenne (à droite) le long des vertèbres lombaires. ....	82
Tableau 4-13 : Densité axonale moyenne (à gauche) et écart type de la densité axonale moyenne (à droite) le long des vertèbres sacrales. ....	83
Tableau 4-14 : Épaisseur moyenne de la gaine de myéline le long des vertèbres cervicales. ....	84
Tableau 4-15 : Écart type de l'épaisseur moyenne de la gaine de myéline le long des vertèbres cervicales. ....	84
Tableau 4-16 : Épaisseur moyenne de la gaine de myéline le long des vertèbres thoraciques. ....	85
Tableau 4-17 : Écart type de l'épaisseur moyenne de la gaine de myéline le long des niveaux thoraciques. ....	85
Tableau 4-18 : Épaisseur moyenne de la gaine de myéline (à gauche) et écart type de l'épaisseur de la gaine de myéline (à droite) le long des niveaux lombaires. ....	86
Tableau 4-19 : Épaisseur moyenne de la gaine de myéline (à gauche) et écart type de l'épaisseur moyenne de la gaine de myéline (à droite) le long des vertèbres sacrales. ....	87
Tableau 4-20 : G-ratio moyen le long des vertèbres cervicales. ....	88
Tableau 4-21 : Écart type du g-ratio moyen le long des vertèbres cervicales. ....	88
Tableau 4-22 : G-ratio moyen le long des vertèbres thoraciques. ....	89
Tableau 4-23 : Écart type du g-ratio moyen le long des vertèbres thoraciques. ....	89

Tableau 4-24 : G-ratio moyen (à gauche) et écart type du g-ratio moyen (à droite) le long des vertèbres lombaires. ....	90
Tableau 4-25 : G-ratio moyen (à gauche) et écart type du g-ratio moyen (à droite) le long des vertèbres sacrales.....	90

## LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Popularité de l'étude sur la moelle épinière de 1976 à aujourd'hui .....	1
Figure 2-1 : A. Niveaux vertébraux chez l'homme, B. Niveaux vertébraux chez le rat. ....	8
Figure 2-2 : Matière grise et matière blanche de la moelle épinière [11] [12].....	9
Figure 2-3 : Atlas des voies spinales de la matière blanche chez l'homme. A. Niveau cervical, B. Niveau lombaire [13]. ....	11
Figure 2-4 : Structure des trois différents types de neurones [15] .....	14
Figure 2-5 : Myélinisation dans le SNC (A) et le SNP (B) [14] .....	16
Figure 2-6 : Dessin de A. Karmansky d'une coupe transversale d'un nerf périphérique montrant les axones entourés d'une gaine de myéline et les nœuds de Ranvier [19]......	17
L'osmolarité se définit par le nombre de particules osmotiquement actives par litre de solution, i.e. le nombre de moles en solution intervenant dans la pression osmotique qui s'exerce sur une membrane lorsqu'il y a un phénomène d'osmose (Figure 2-7). ....	23
Figure 2-8 : Osmolarité d'une solution et son effet sur la membrane plasmique de la cellule (en rouge). Les flèches indiquent la direction dans laquelle l'eau se déplace via l'osmose. ....	23
Figure 2-9 : Segment cervical de la moelle épinière en microscopie optique [60]......	27
Figure 2-10 : Image CARS d'une section de moelle épinière [69]......	28
Figure 2-11 : Image MET d'axones de nerfs optiques de souris, échelle 2 $\mu\text{m}$ [70]. ....	29
Figure 2-12 : Image MEB d'axones de la matière blanche de moelle épinière chez le rat. ....	30
Figure 2-13 : Les atlas de la matière blanche de la moelle épinière dans la littérature : (a) atlas de niveau cervical avec les tracts suivant représentés : rubrospinal (1), dorsal corticospinal (2), fasciculus cuneatus (3), fasciculus gracilis (4), reticulospinal (5), vestibulospinal (6), (7), (8). (b) atlas de niveau cervical issu du livre de Paxinos, (c) atlas niveau cervical avec les tracts suivant représentés : en rouge, le rubrospinal, en jaune, le reticulospinal, en orange, le vestibulospinal, en bleu foncé, les fasciculus cuneatus et gracilis, en marron, le corticospinal, en bleu clair, le spinocerebellar, en bleu medium le spinothalamic et en gris le fasciculus proprius [108] [109] [110]......	41



Figure 3-1 : Les étapes de la préparation du tissu. ....	44
Figure 3-2 : Distance de travail au microscope électronique à balayage. ....	50
Figure 3-3 : Aperçu général de la méthode pour la construction de l'atlas de la matière blanche chez le rat .....	53
Figure 3-4 : Assemblage des sous-images après l'acquisition au MEB pour générer la mosaïque complète de la matière blanche. ....	54
Figure 3-5 : Atlas de coupes histologiques de la matière blanche. ....	55
Figure 3-6 : Identification des niveaux vertébraux des échantillons acquis au MEB. ....	56
Figure 3-7 : Illustration des principales étapes de la segmentation par AxonSeg.....	57
Figure 3-8 : Sous-échantillonnage de la matière blanche segmentée.....	61
Figure 3-9 : Méthode de quantification de la préservation de la matière blanche. ....	62
Figure 3-10 : Méthode de la construction de l'atlas de la matière blanche de la moelle épinière chez le rat. ....	64
Figure 3-11 : Méthode d'extraction des métriques pour chaque tract à partir de l'atlas de référence. ....	65
Figure 3-12 : Atlas de référence pour le recalage et l'extraction des métriques.....	66
Figure 3-13: Mesure du diamètre axonal par AxonSeg. ....	66
Figure 3-14 : Mesure de la densité axonale par AxonSeg.....	67
Figure 3-15 : Mesure de l'épaisseur de la gaine de myéline par AxonSeg.....	67
Figure 3-16 : Illustration du g-ratio.....	67
Figure 4-1 : Coupes histologiques segmentées des niveaux vertébraux. ....	68
Figure 4-2 : Validation de la segmentation automatique par AxonSeg. ....	69
Figure 4-3 : Résultats de l'identification des niveaux vertébraux : prédiction et exactitude.....	70
Figure 4-4 : Résultats de l'identification des niveaux : prédiction et exactitude.....	71

Figure 4-5 : Cartes moyennées pour le diamètre axonal le long des niveaux vertébraux entre les rats. ....	72
Figure 4-6 : Cartes moyennées pour la densité axonale le long des niveaux vertébraux entre les rats. ....	73
Figure 4-7 : Cartes moyennées pour le g-ratio le long des niveaux vertébraux entre les rats.....	74
Figure 4-8 : Diamètre axonal des cartes moyennées le long des niveaux vertébraux entre les rats avec g pour gauche et d pour droite. ....	79
Figure 4-9 : Densité axonale des cartes moyennées le long des niveaux vertébraux entre les rats avec g pour gauche et d pour droite. ....	83
Figure 4-10 : Épaisseur de la gaine de myéline des cartes moyennées le long des niveaux vertébraux entre les rats avec g pour gauche et d pour droite. ....	87
Figure 4-11 : G-ratio des cartes moyennées le long des niveaux vertébraux entre les rats avec g pour gauche et d pour droite.....	91
Figure 4-12 : Diamètre axonal aux niveaux C (N=3), T (N=4), L (N=3) et S (N=2) moyennés. ...	92
Figure 4-13 : Densité axonale aux niveaux C (N=3), T (N=4), L (N=3) et S (N=2) moyennés. ...	92
Figure 4-14 : Épaisseur de la gaine de myéline aux niveaux C (N=3), T (N=4), L (N=3) et S (N=2) moyennés.....	93
Figure 4-15 : G-ratio aux niveaux C (N=3), T (N=4), L (N=3) et S (N=2) moyennés. ....	93
Figure 4-16 : Latéralité Gauche/Droite pour le diamètre axonal le long des vertèbres cervicales.	94
Figure 4-17 : Latéralité Gauche/Droite pour le diamètre axonal le long des vertèbres thoraciques. ....	95
Figure 4-18 : Latéralité Gauche/Droite pour le diamètre axonal le long des vertèbres lombaires.	95
Figure 4-19 : Latéralité Gauche/Droite pour le diamètre axonal le long des vertèbres sacrales....	96
Figure 4-20 : Latéralité Gauche-Droite pour la densité axonale le long des vertèbres cervicales.	97
Figure 4-21 : Latéralité Gauche-Droite pour la densité axonale le long des vertèbres thoraciques. ....	97

Figure 4-22 : Latéralité Gauche-Droite pour la densité axonale le long des vertèbres lombaires.	98
Figure 4-23 : Latéralité Gauche-Droite pour la densité axonale le long des vertèbres sacrales. ...	98
Figure 4-24 : Latéralité Gauche/Droite de l'épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres cervicales. ....	99
Figure 4-25 : Latéralité Gauche/Droite pour l'épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres thoraciques. ....	99
Figure 4-26 : Latéralité Gauche/Droite pour l'épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres lombaires. ....	100
Figure 4-27 : Latéralité Gauche/Droite pour l'épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres sacrales. ....	100
Figure 4-28 : Latéralité Gauche/Droite pour le g-ratio le long des vertèbres cervicales. ....	101
Figure 4-29 : Latéralité Gauche/Droite pour le g-ratio le long des vertèbres thoraciques. ....	101
Figure 4-30 : Latéralité Gauche/Droite pour le g-ratio le long des vertèbres lombaires. ....	102
Figure 4-31 : Latéralité Gauche/Droite pour le g-ratio le long des vertèbres sacrales. ....	102
Figure 5-1 : Artéfacts de fixation causés lors de la préparation des tissus. ....	103
Figure 5-2 : Recalage des cartes moyennées entre rat après une transformation SyN. ....	105

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A	Adenylyl cyclase 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
dCST	Dorsal Corticospinal Tract
DMP-30	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol
DDSA	Dodecenylsuccinic anhydride
FC	Fasiculus Cuneatus
FG	Fasiculus Gracilis
Ga	Glutaraldéhyde
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MB	Matière Blanche
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MET	Microscope Electronique à Transmission
MG	Matière Grise
MO	Microscope Optique
NMA	Nadic Methyl Anhydride
OsO <sub>4</sub>	Tétroxyde d'osmium
PBS	Phosphate Buffer Saline
PFA	Paraformaldéhyde
ReST	Reticulospinal Tract
RST	Rubrospinal Tract
SNC	Système Nerveux Central
STT	Spinothalamic Tract
VST	Vetibulospinal Tract

## LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A – RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....	127
ANNEXE B – PHANTOMS DE MYELINE PAR CO-ELECTROSPINNING .....	135

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

### 1.1 Contexte de la recherche

La matière blanche de la moelle épinière est constituée de bouquets de fibres nerveuses myélinisées et non myélinisées. Chaque bouquet de fibres, aussi appelé tract, tractus ou voie, transmettent des signaux électriques, ascendants et descendants, le long de la moelle épinière et sont essentielles pour assurer la synergie entre le système nerveux périphérique et le cerveau. Tout dommage de l'axone a des répercussions dramatiques sur le fonctionnement moteur et sensoriel, entraînant par exemple une perte de motricité et de sensation selon la localisation du dommage dans la moelle.

En juin 2017, le nombre d'articles utilisant le mot *spinal cord* s'élève à 188 562 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

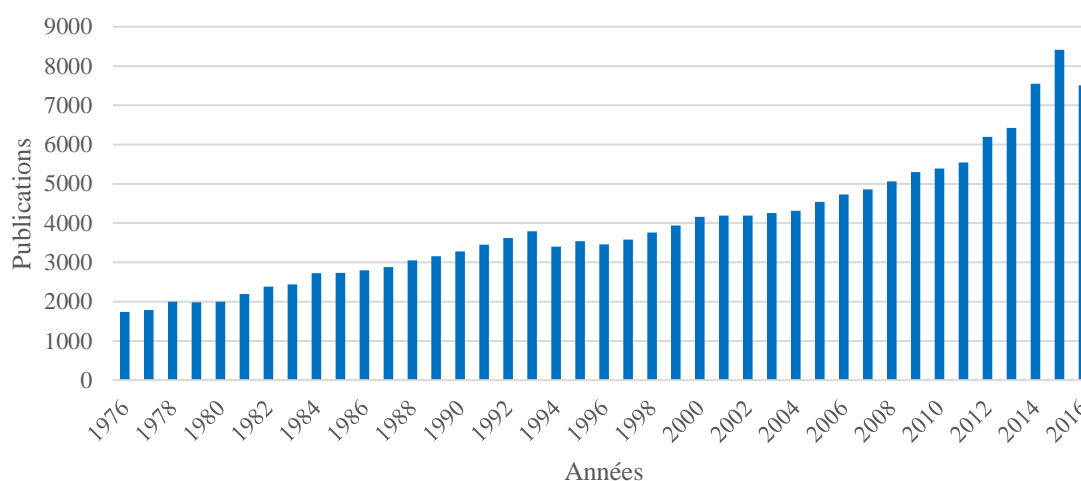


Figure 1-1 : Popularité de l'étude sur la moelle épinière de 1976 à aujourd'hui

Les pathologies de la moelle épinière, c'est-à-dire les maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaques sont problématiques. Il s'agit d'une maladie s'attaquant au système nerveux central (cerveau et moelle épinière) et plus précisément à la myéline, gaine qui entoure la fibre nerveuse appelée axone.

La sclérose en plaques est le plus souvent diagnostiquée chez les adultes de 15 à 40 ans et les femmes sont trois fois plus nombreuses que les hommes à être diagnostiquées [1]. Les pays ayant l'incidence de la sclérose en plaques la plus élevée pour 100 000 habitants sont le Canada avec une incidence de 291/100 000 habitants, San Marino avec 250/100 000 habitants, le Danemark avec

227/100 000 habitants et la Suède avec 189/100 000 habitants. La prévalence médiane globale est de 30/100 000 habitants. La sclérose en plaques touche plus de 2.5 millions de personnes dans le monde [2].

Cependant les mécanismes pathophysiologiques de cette maladie, tels que les évènements neurotoxiques survenant après un traumatisme [3] [4], restent encore mal compris. Ainsi, des études pré-cliniques sur le modèle animal est utile pour mieux comprendre les mécanismes pathophysiologiques de cette maladie. Malgré des différences au niveau de l'organisation structurale (par exemple le nombre de vertèbres, la forme de la matière blanche, et le nombre de tracts différent) de la moelle épinière avec l'humain, le rat est le modèle animal le plus utilisé pour l'étude de la moelle épinière. En effet, le rat, est bon marché, accessible et les techniques d'analyse de son anatomie et du fonctionnement de son organisme sont bien connus [5] [6] [7].

À partir des observations histologiques, les neuroscientifiques ont mis en évidence un lien entre la microstructure axonale et les caractéristiques du signal neuronal. Ils l'ont modélisé et ils peuvent ainsi mieux comprendre les fonctions du cerveau et sa physiologie [8].

Au laboratoire Neuropoly, les étudiants développent des techniques d'histologie, des acquisitions d'imagerie et des biomarqueurs d'IRM pour l'analyse quantitative de la microstructure de la matière blanche de la moelle épinière chez l'humain et sur des modèles animaux.

## 1.2 Motivations

La communauté neuroscientifique porte un grand intérêt à la microstructure des axones, leur diamètre, leur forme, leur densité et leur degré de myélinisation. En effet ces résultats aident à la compréhension des pathologies de la matière blanche de la moelle épinière et l'existence d'une base de données sur cette microstructure chez les modèles de rat sain (et malade) permettrait de valider les résultats obtenus par les différents groupes de recherche.

Cependant, la documentation sur la microstructure de la matière blanche reste très limitée; ces études nécessitent de connaître la microstructure de la matière blanche chez le rat sain. En effet, la plupart des maladies neurologiques présentent les caractéristiques histopathologiques suivantes : perte de neurones et dégénération axonale, ce qui peut affecter l'intensité des images, permettant ainsi aux techniques d'imagerie de la microstructure de détecter ces anomalies. C'est pourquoi,

pour pouvoir rapporter les modifications microstructurales dans les lésions de la matière blanche, il est nécessaire d'avoir une bonne connaissance d'une microstructure saine.

Les travaux histologiques datent de plusieurs décennies et certains sont dessinés à la main et ne sont pas quantitatifs en termes de diamètre axonal, densité axonale, degré de myélinisation etc. ... De plus, la microscopie électronique à transmission, qui est la microscopie la plus utilisée dans les études histologiques, présentent de nombreuses limitations : (i) il est difficile de localiser la région à analyser dans l'échantillon, (ii) seulement une infime partie de l'échantillon est analysée (le champ de vision est faible; de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ ). De plus, il n'existe pas de statistiques spécifiques à chaque tract de la matière blanche de la moelle épinière. Et les connaissances actuelles sont limitées par le nombre restreint d'études dans ce domaine.

Bien qu'il y ait eu des tentatives pour traiter cette question, aujourd'hui il n'existe pas de bases de données histologiques de la microstructure de la matière blanche de la moelle épinière entière de rat.

## **1.3 Objectifs**

### **1.3.1 Objectifs généraux**

L'idée principale du projet est d'optimiser les protocoles d'histologie de la matière blanche de la moelle épinière pour pouvoir en extraire des informations sur la microstructure tel que le diamètre axonal. Ainsi les objectifs principaux sont :

Objectif général 1 : Fournir le premier atlas microstructural de la matière blanche chez le rat construit à partir d'images histologiques *ex vivo* de haute résolution acquises le long de toutes les vertèbres.

Objectif général 2 : Fournir nos données histologiques de la moelle épinière en libre accès.

### **1.3.2 Objectifs spécifiques**

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

Objectif spécifique 1 : Acquérir des images de la moelle épinière de rat (N=5) de C1 (première cervicale) à L6 (sixième lombaire) en utilisant la microscopie électronique à balayage.



Objectif spécifique 2 : Mesurer les métriques microstructurales, tels que le diamètre axonal, la forme de l'axone (circularité, ellipticité, solidité), la densité axonale, l'épaisseur de la gaine myéline et le degré de myélinisation (g-ratio).

Objectif spécifique 3 : Créer des cartographies de ces métriques moyennées sur les N=5 rats.

Objectif spécifique 4 : Calculer les statistiques au sein de tracts spécifiques (fasiculus cuneatus, fasiculus gracilis, rubrospinal, vestibulospinal, reticulospinal, dorsal corticospinal).

Objectif spécifique 5 : Étudier la variabilité de la morphologie axonale au travers des N=5 rats, des niveaux vertébraux et des tracts.

## 1.4 Hypothèses scientifiques

Hypothèse 1 : La microscopie électronique à balayage permet d'acquérir la moelle épinière en entier à une résolution suffisante pour pouvoir observer la microstructure de la matière blanche.

*Originalité* : A ce jour aucun groupe n'a produit des images de la moelle épinière en entier avec cette microscopie.

*Acceptabilité* : L'hypothèse sera acceptée si les données microstructurales fournies par les images histologiques sont en accord avec les gold-standards rapportés dans la littérature.

Hypothèse 2 : Notre protocole histologique permet de bien préserver l'ultrastructure de la matière blanche.

*Originalité* : A ce jour les protocoles histologiques de routine ne sont pas adaptés pour préserver au mieux la structure des axones. Nous avons optimisé ces protocoles en optimisant chacune des étapes de la préparation du tissu.

*Acceptabilité* : L'hypothèse sera acceptée si les données microstructurales fournies par les images histologiques sont en accord avec les gold-standards rapportés dans la littérature.

## 1.5 Publications

Durant ces deux années de maîtrise, j'ai travaillé sur deux projets. Mon premier projet consistait à synthétiser des phantoms de myéline, mimant au mieux les propriétés mécaniques et structurales de la myéline, à base de polymères. Cependant à la fin de ma première année de maîtrise, ce projet s'est avéré être trop ambitieux dans le cadre d'une maîtrise. En effet, j'ai réussi à synthétiser des

fibres de l'ordre du nanomètre et micromètre et à les rendre parallèles entre elles mais non creuses. En annexe B vous trouverez les résultats que j'ai obtenus.

C'est pourquoi j'ai débuté un nouveau projet à partir de ma deuxième année de maîtrise sur la création d'un atlas de la microstructure de la matière blanche de la moelle épinière chez le rat, à partir d'études histologiques.

Suite à ce dernier projet deux articles vont très prochainement être publiés :

- Axon and myelin morphology in animals and human spinal cord, **A. Saliani**, B. Perraud, T. Duval, N. Stikov, S. Rossignol, J. Cohen Adad, Neurofrontiers in Neuroanatomy, août 2017.
- Construction of an *ex vivo* rat spinal cord atlas of axonal morphology using full-slice histology, **A. Saliani**, T. Duval, N. Stikov, J. Cohen-Adad, PlosOne, automne 2017.

## 1.6 Organisation du présent mémoire

Ce mémoire est organisé en six chapitres. Le Chapitre 1 est la présente introduction. Le Chapitre 2 est la revue de littérature du projet de recherche. Elle introduit l'anatomie du SNC avec une emphase portée, dans un premier temps, sur la physiologie de l'axone (ou neurone) et le processus de myélinisation. Ensuite, les techniques histologiques pour préparer le tissu nerveux sont présentées, suivies des différents types d'imagerie pour l'observer. Puis, les valeurs recueillies dans la littérature pour quantifier le diamètre axonal, la densité axonale, l'épaisseur de la myéline et le g-ratio, sont rapportées. La troisième partie de cette revue de littérature énumère les méthodes utilisées pour créer un atlas et s'interroge sur les atlas de la matière blanche existants. Enfin, l'originalité du projet est mise en lumière.

Le Chapitre 3 explique les matériaux utilisés et les méthodes mises au point pour créer l'atlas de la microstructure de la matière blanche chez le rat.

Le Chapitre 4 présente les résultats du projet.

Le Chapitre 5 discute les résultats obtenus par rapport à ceux de la revue de littérature. Les limitations et les potentielles faiblesses du projet sont mentionnées, mais, permettent de suggérer des améliorations pour les chercheurs intéressés par cette étude.

Le Chapitre 6 conclut ce mémoire de maîtrise par un bilan de la recherche et l'évocation de futures perspectives de l'atlas de la matière blanche chez le rat.

## CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

### 2.1 La moelle épinière chez les vertébrés

#### 2.1.1 Anatomie

Le système nerveux est composé du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique (SNP). Le système nerveux central est composé de trois structures : le cerveau, le tronc cérébral, le cervelet et la moelle épinière. Ces structures sont confinées dans la boîte crânienne (cerveau) et dans la colonne vertébrale (moelle épinière). Le SNP, quant à lui, est constitué de nerfs crâniens et vertébraux.

La moelle épinière est un long tube vertical contenu dans la colonne vertébrale et dont les coupes axiales à différents niveaux peuvent présenter une forme elliptique (niveau cervical), circulaire (niveau thoracique) ou ovale (niveau sacral).

Chez l'homme on distingue 31 niveaux vertébraux : 8 cervicales (C1-C8), 13 vertèbres thoraciques (T1-T13), 5 vertèbres lombaires (L1-L5) et 5 vertèbres sacrales (S1-S5). Chez le rat, la moelle épinière se divise en 34 niveaux vertébraux avec 8 cervicales (C1-C8), 13 vertèbres thoraciques (T1-T13), 6 lombaires (L1-L6), 4 vertèbres sacrales (S1-S4) et 3 vertèbres coccygiennes (Co1-Co3). Elle comporte deux structures différentes : la matière grise qui forme un H ou un papillon, entourée par la matière blanche.

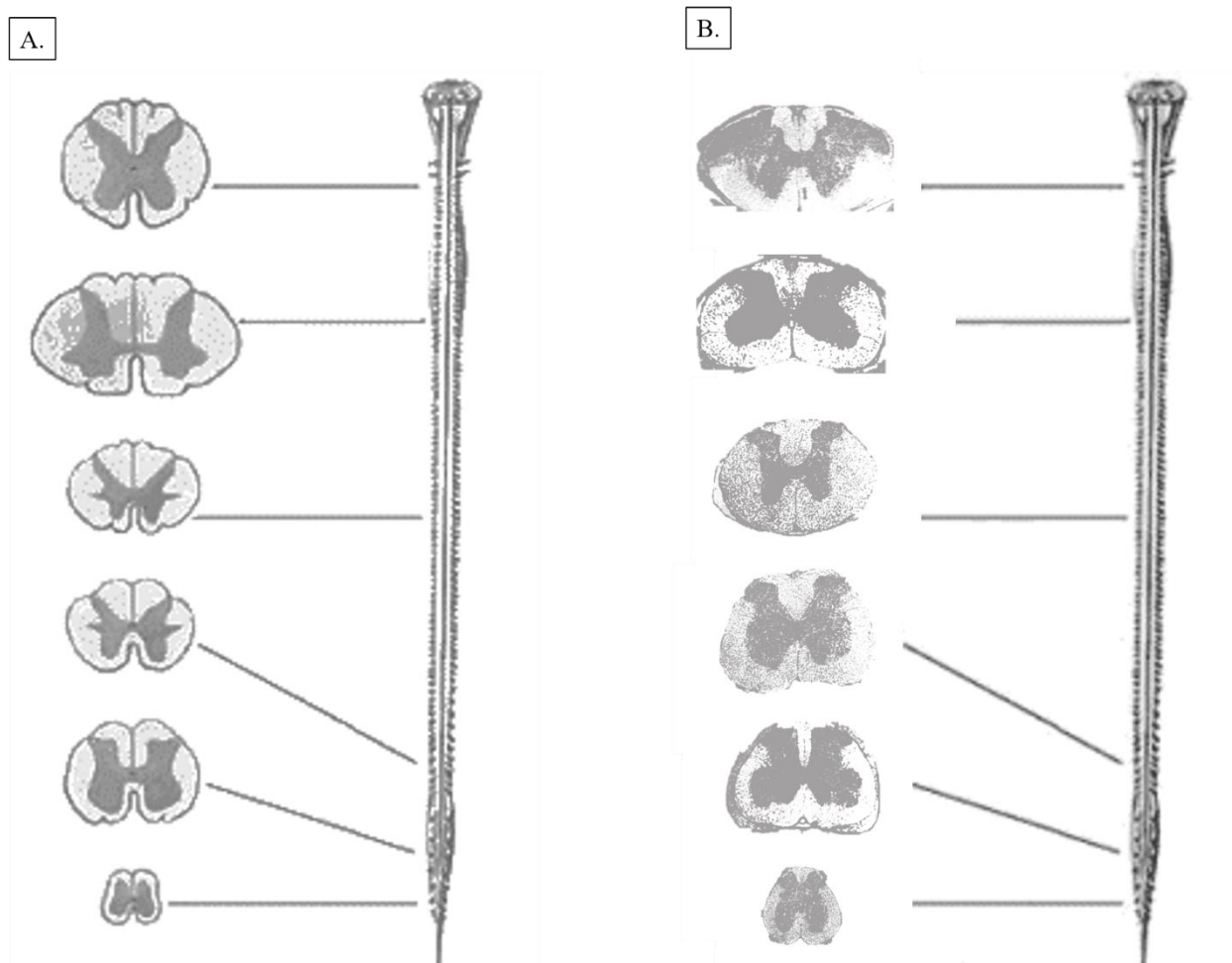


Figure 2-1 : A. Niveaux vertébraux chez l'homme, B. Niveaux vertébraux chez le rat.

### 2.1.2 La matière grise

La matière grise est composée principalement des corps cellulaires des neurones et des cellules gliales (astrocytes, microglies et oligodendrocytes), du neuropile (dendrites, axones myélinisés et non myélinisés), synapses et capillaires sanguins. La matière grise se distingue de la matière blanche par un nombre élevé de corps cellulaires et très peu d'axones myélinisés. La matière blanche contient très peu de corps cellulaires et contient des axones myélinisés de différent diamètre. La différence de couleur entre la matière grise et la matière blanche est principalement due à la couleur blanche de la gaine de myéline qui entoure l'axone. Dans le tissu vivant, la matière grise a une couleur grise légère avec des tons jaunâtres ou rosâtres, dû aux capillaires sanguins et aux corps cellulaires.

La matière grise est présente dans le cerveau, le tronc cérébral, le cervelet et la moelle épinière. Elle est divisée en quatre groupes cellulaires : les cornes dorsales ou postérieures droites et gauches liées entre elles par la commissure grise au centre et les cornes ventrales ou antérieures, droite et gauche. Dans la moelle épinière, la matière grise a une forme de H ou de papillon et entoure le canal épendymaire par ses cornes antérieure et postérieure et est donc entourée par la matière blanche en périphérie. Les parties latérales de la matière grise se relient via la commissure grise, constituées d'interneurones et de corps cellulaires.

La matière grise (Figure 2-2) inclut les régions du cerveau impliquées dans le contrôle musculaire, la perception sensorielle (vue, écoute, mémoire, langage ...). Les cornes antérieures contiennent les neurones efférents, moteurs dont les fibres sortent de la moelle par les racines ventrales et est responsable du mouvement musculaire. Ces neurones moteurs envoient leurs axones aux muscles squelettiques (ou organes effecteurs) via les radicelles ventrales qui fusionnent entre elles pour former les racines ventrales de la moelle épinière. Les cornes postérieures contiennent des interneurones et des terminaisons neuronales des fibres afférentes primaires qui entrent dans la moelle par les racines dorsales. Les cornes latérales contiennent les neurones moteurs qui servent tous les organes viscéraux. Leurs axones quittent la moelle via la racine ventrale [9] [10].

Le volume de matière grise présent à un niveau donné de la moelle épinière reflète le nombre de muscle squelettique innervé à ce niveau. C'est pourquoi, les cornes antérieures sont plus volumineuses au niveau cervical et lombaire de la moelle épinière.

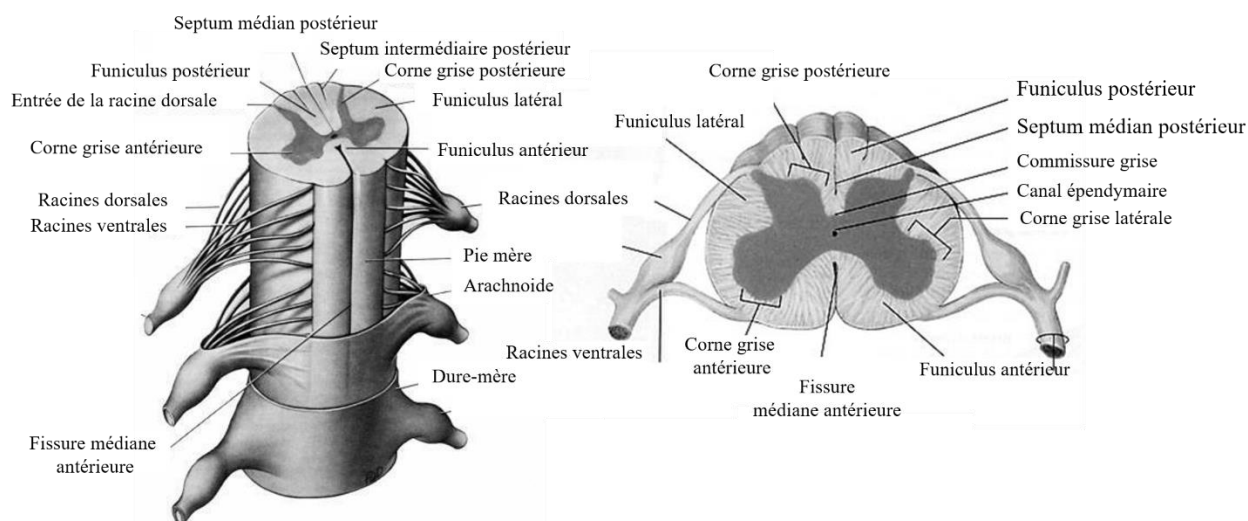


Figure 2-2 : Matière grise et matière blanche de la moelle épinière [11] [12]

### 2.1.3 La matière blanche

La matière blanche (Figure 2-3) de la moelle épinière est constituée de faisceaux de fibres nerveuses appelées axones, gainées de myéline ou non, qui permettent aux différentes parties de la moelle épinière et au cerveau de communiquer. Le diamètre de ces axones varie de 1 à 10  $\mu\text{m}$  chez l'homme et de 200 nm à 3  $\mu\text{m}$  chez le rat.

Ces fibres sont orientées dans trois directions : voie ascendante (les fibres afférentes primaires entrent dans la moelle via les racines dorsales ou les fibres afférentes de la matière grise conduisant l'information dans les niveaux supérieurs), voie descendante (les fibres provenant du cortex et du tronc cérébral) et voie propriospinale (composée des fibres ascendantes et descendantes situées dans la matière grise assurant la communication entre les segments vertébraux) [13].

La matière blanche est divisée, de chaque côté, en trois colonnes ou funiculi, elles sont nommées en fonction de leur position : colonne dorsale (postérieure), ventrale (antérieure) et latérale. Chaque funiculus contient plusieurs tracts de fibres, et chacun de ces tracts est composé d'axones qui ont les mêmes destinations et fonctions.

Ces tracts ou voies spinales constituent les voies ascendantes et descendantes et ne contiennent non seulement les neurones de la moelle épinière mais aussi une partie des neurones périphériques et neurones du cerveau.

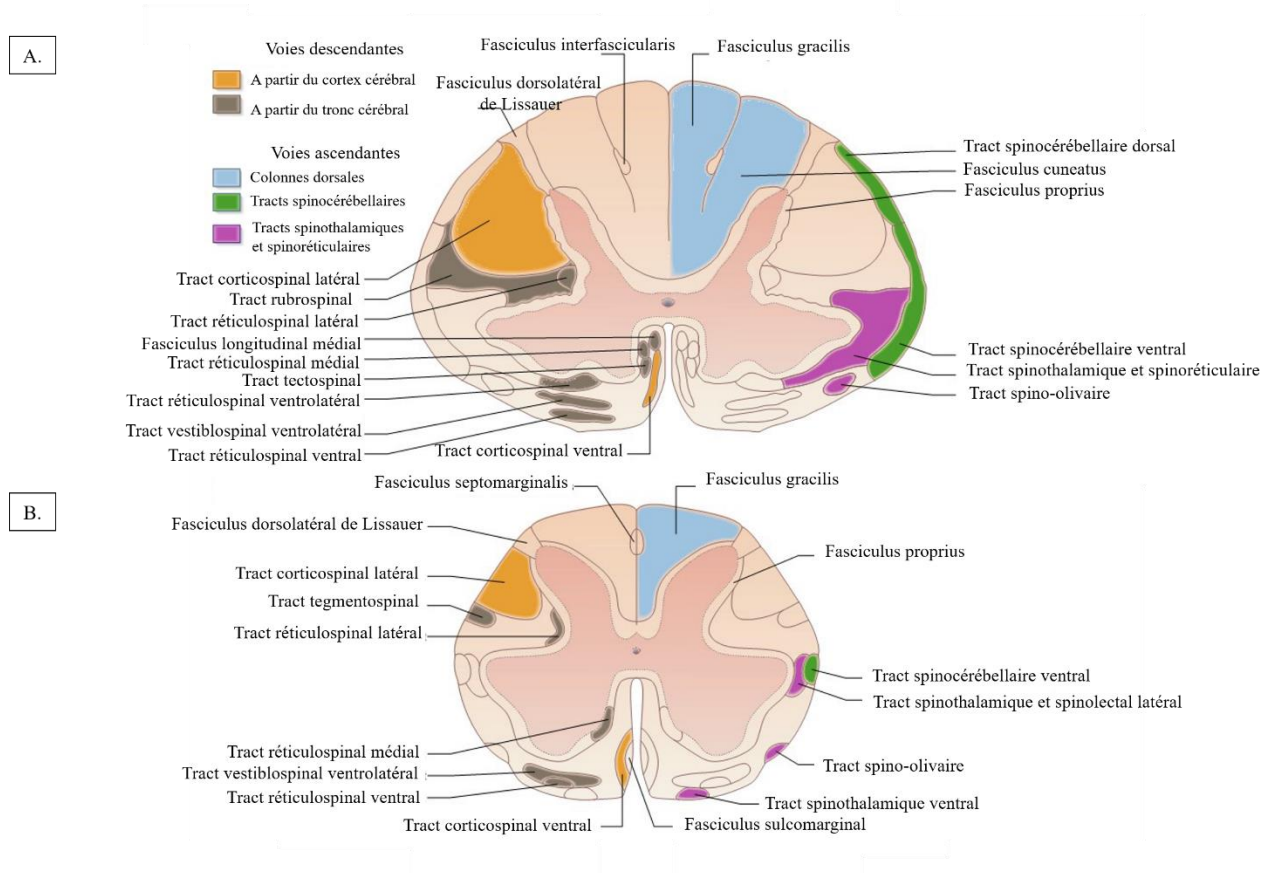


Figure 2-3 : Atlas des voies spinales de la matière blanche chez l'homme. A. Niveau cervical, B. Niveau lombaire [13].

Le tableau 2-1. Répertorie les fonctions des différents tracts de la matière blanche et les différentes parties du corps impliquées [14].

Le terme décussation désigne le croisement en forme de X des fibres nerveuses.



Tableau 2-1 : Fonctions des différents tracts de la matière blanche.

Nom du tract	Fonction	Membre/Organe ciblé	Niveau de décussation
Voies ascendantes			
Fasciculus gracilis (FG)	Mouvement, proprioception, coordination	Membres inférieurs	Médulla
Fasciculus cuneatus (FC)	Mouvement, proprioception, coordination	Membres supérieurs	Médulla
Spinocérébellaire dorsal	Informe le cervelet de l'état des muscles (tension, longueur)	Membres inférieurs, tendons de Golgi	Aucune
Spinocérébellaire ventral	Informe le cervelet sur les mouvements des membres	Membres inférieurs, tendons de Golgi	-pédoncule cérébelleux supérieur - commissure ventrale (niveau L3)
Spinothalamique et spinoréticulaire (voie lemniscale)	Douleur, sensibilité à la température et tactile	Membres inférieurs, supérieurs, tronc	Commissure ventrale (niveau C8, T4, L2, L3, S2)
Fasciculus longitudinal médial	Contrôle la position de la tête	Tête, cou	Projette ipsilatéralement
Spino-olivaire	Transmet l'information provenant des muscles et tendons au cervelet	Organes cutanés et proprioceptifs	-medulla Projette ipsilatéralement
Voies descendantes			
Corticospinal latéral	Contrôle les mouvements rapides et volontaires	Membres inférieurs et supérieurs	Medulla

(Suite du Tableau 2-1)

Corticospinal ventral	Contrôle les mouvements des parties distales des extrémités	Avant-bras, main, pied, muscles du dos	À différents segments
Rubrospinal	Stimule les neurones moteurs fléchisseurs et inhibe les neurones moteurs extenseurs	Membres inférieurs et supérieur	Cerveau moyen
Tectospinal	Dirige les mouvements de la tête	Tête	Cerveau moyen
Vestibulospinal latéral	Contrôle les muscles responsables de la posture verticale et de l'équilibre	Dos, tronc, membres	Aucune
Réticulospinal ventral	Perception et modulation de la douleur	Tête, tronc, membre	
Réticulospinal ventrolatéral	Contrôle les systèmes sympathiques et parasympathiques	Organes viscéraux	

## 2.1.4 Le neurone

Le neurone (Figure 2-4, [15] ) est formé de trois grandes parties :

- L'axone : partie émettrice du neurone consistant en un prolongement unique qui transmet le message nerveux aux neurones situés en aval du réseau ou au tissu cible (organe).
- Les dendrites : partie réceptrice du neurone formant une arborisation très ramifiée autour du corps cellulaire.
- Le corps cellulaire : il intègre les informations reçues par les dendrites.

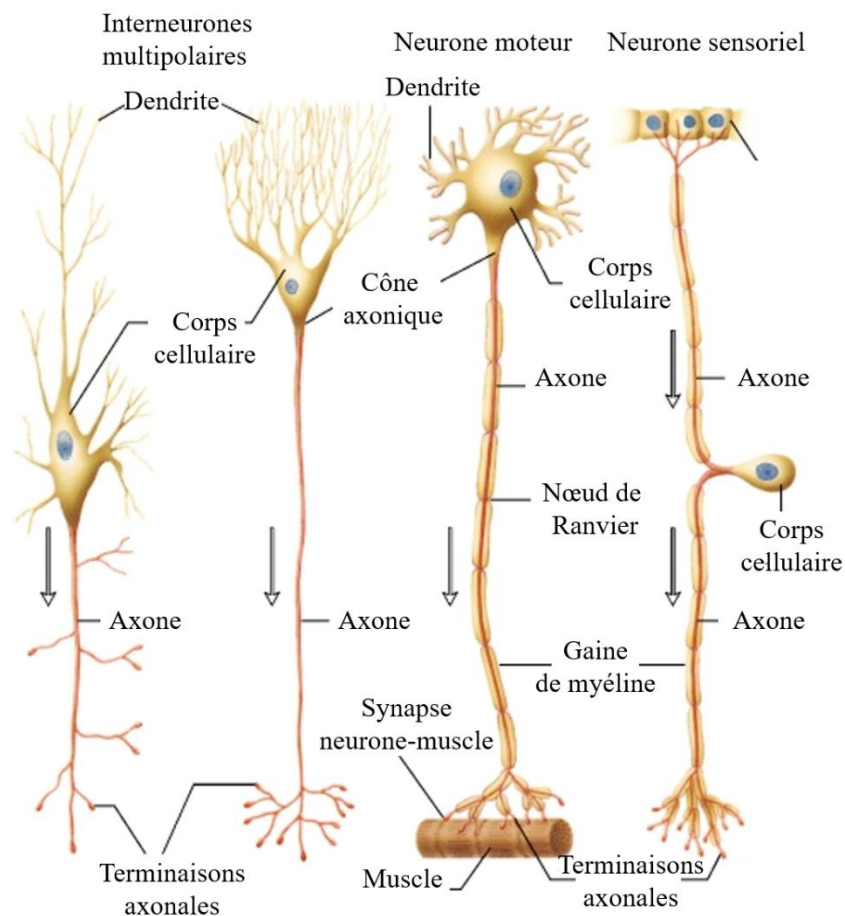


Figure 2-4 : Structure des trois différents types de neurones [15]

L'influx nerveux est donc une impulsion électrique qui se propage le long de l'axone suite à une réponse à un stimulus émis depuis le corps cellulaire du neurone.

Les neurones peuvent être myélinisés ou non, la myéline qui entoure certains axones est une substance grasseuse blanche formant une couche isolante électrique. La composition de la myéline

est particulière par rapport à une membrane cellulaire classique. Alors que les membranes cellulaires classiques sont composées de 70% de protéines et de 30% de lipide, les proportions sont inversées pour la myéline. Il s'agit d'un système biologique hautement organisé constitué de multicouches concentriques.

Dans le système nerveux central, les principales protéines sont la protéo-lipide-protéine (PLP) à 50 %, la *myelin basic protein* (MBP) à 30 % et la *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) à 1%. Bien que la MOG soit la protéine la moins abondante dans la myéline, elle est à l'origine de la sclérose en plaques.

La fonction principale de la gaine de myéline est d'augmenter la vitesse à laquelle chaque impulsion électrique se propage le long de la fibre myélinisée. Les impulsions électriques le long des fibres non myélinisées se propagent par vagues tandis que les fibres myélinisées se propagent par conduction saltatoire. La myéline diminue la capacitance et accroît la résistance électrique à travers la membrane cellulaire.

### **2.1.5 Le processus de myélinisation**

C'est en 1839 que Remak découvre l'existence de deux types de fibres nerveuses; les axones entourés par une couche de myéline et les axones dits nus, c'est-à-dire dépourvus de myéline [16]. Et c'est en 1854 qu'un médecin allemand, Rudolph Virchow, propose d'appeler cette couche qui enveloppe les axones, myéline [17].

Ainsi, la première fonction de la myéline est de protéger l'axone. La deuxième fonction de la myéline consiste à accélérer la vitesse de la conduction de l'influx nerveux. La transmission du potentiel d'action peut être accélérée de deux façons : soit en augmentant le diamètre de l'axone soit envelopper l'axone d'une couche de myéline. La première solution fut adoptée par les céphalopodes, organismes invertébrés tels que le calmar ou le poulpe, dont le diamètre axonal peut atteindre un millimètre, soit plus de cent fois celui de nos propres axones, qui mesure entre 1 et 9 micromètres. La deuxième solution fut adoptée par la grande majorité des vertébrés, pour une raison anatomique; le cerveau est confiné dans la boîte crânienne et la moelle épinière dans la colonne vertébrale. Du fait de cette contrainte physique, pour accélérer l'influx nerveux, l'évolution a permis à ces axones d'être enrobés de la myéline.

La troisième fonction de la myéline a été découverte récemment; les cellules productrices de la myéline fourniraient les nutriments et contribueraient à préserver l'intégrité des axones [18].

Deux types de cellules produisent la myéline : les oligodendrocytes, dans le système nerveux central et les cellules de Schwann, dans le système nerveux périphérique.

Bien que les mécanismes et processus de la myélinisation (Figure 2-5, [14]) ne sont, à ce jour, pas complètement compris, certaines étapes du processus sont connus : (i) contact axonal, (ii) production du gène des cellules gliales, (iii) enrobage de l'axone, et (iv) maturation.

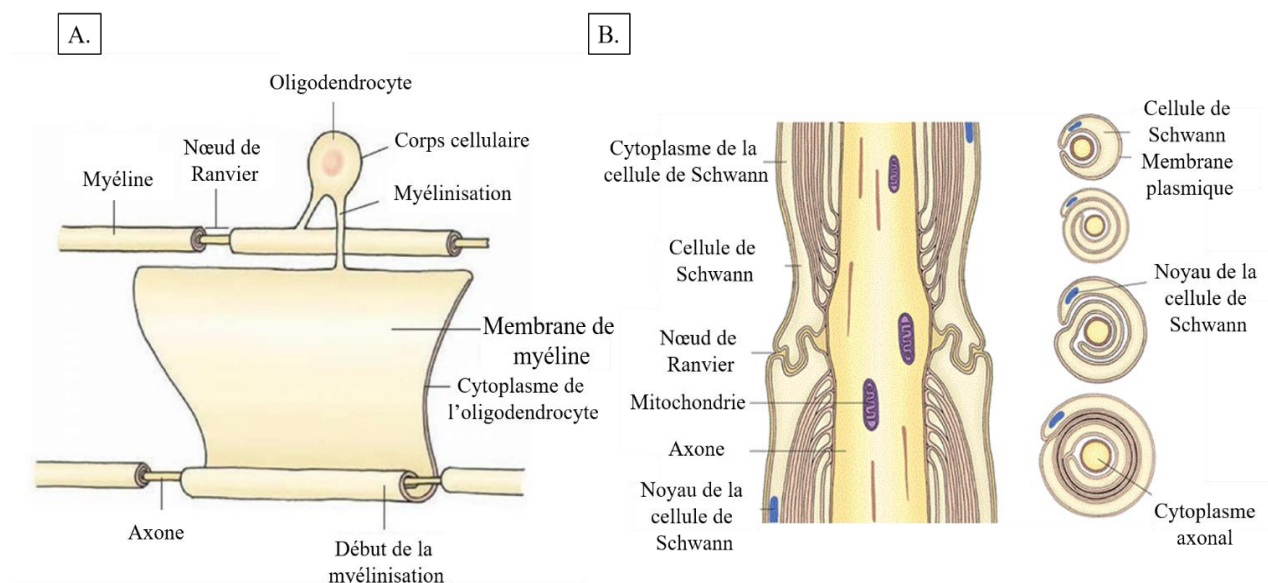


Figure 2-5 : Myélinisation dans le SNC (A) et le SNP (B) [14]

La sclérose en plaques multiple est une maladie démyélinisante du SNC qui se caractérise par une démyélinisation des axones de la matière blanche. Étant donné que la morphologie de la moelle varie selon le niveau vertébral, il est intéressant de connaître les caractéristiques microstructurales (diamètre axonal, densité axonale, épaisseur de la gaine de myéline...) pour un sujet en santé afin d'être capable de détecter toute anomalie de ces biomarqueurs.

## 2.2 Histologie de la matière blanche

C'est en 1878 que l'histologiste Louis Ranvier a été le premier à découvrir que la gaine de myéline n'est pas continue autour de l'axone mais est interrompue à intervalles réguliers nommés nœuds de Ranvier.

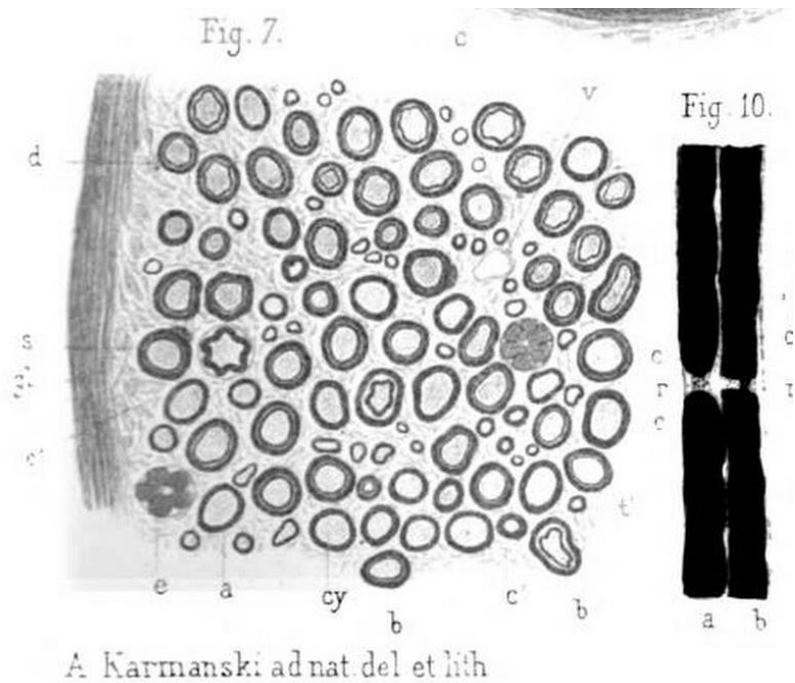
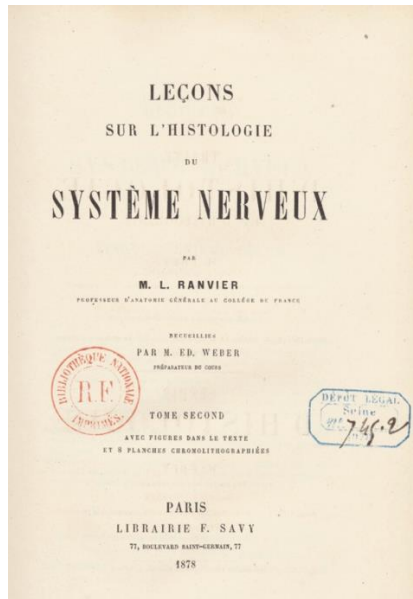


Figure 2-6 : Dessin de A. Karmansky d'une coupe transversale d'un nerf périphérique montrant les axones entourés d'une gaine de myéline et les nœuds de Ranvier [19].

### 2.2.1 Préparation du tissu

Plusieurs facteurs peuvent affecter la qualité de la préparation du tissu tels que la méthode de fixation, la concentration de fixatifs, la durée de la fixation, la température et le pH de fixation, l'osmolarité des solutions, la coloration du tissu, le choix de la solution tampon, la déshydratation et l'enrobage.

### 2.2.1.1 Protocoles de fixation

- Techniques de fixation

Les méthodes de fixation ont plusieurs objectifs : (i) d'arrêter le métabolisme cellulaire, (ii) de fixer les structures et réticuler les molécules tout en les préservant [20], (iii) de rendre le tissu observable en microscopie.

Quand l'activité métabolique cellulaire n'est pas stoppée, des changements autolytiques peuvent survenir dans les secondes et minutes de la fixation. C'est pourquoi, l'utilisation d'un tissu frais non endommagé est d'une grande importance.

Le tissu peut être fixé de deux manières. La première méthode, appelée immersion, consiste à immerger le tissu dans une solution de fixatifs jusqu'à ce que le tissu soit fixé. Cette méthode est plus susceptible de laisser le centre du bloc de tissu non fixé dépendamment du temps de fixation et de l'épaisseur du tissu. La seconde méthode, appelée perfusion, consiste à rincer le tissu en injectant directement dans la circulation principale les solutions tampon et de fixatifs. Le débit de perfusion doit être ajusté en fonction de la pression sanguine : un débit trop fort pourrait faire exploser les vaisseaux tandis qu'une pression trop basse pourrait avoir un effet néfaste sur la vitesse de fixation.

Il est généralement accepté que la perfusion vasculaire est une étape nécessaire pour les tissus qui sont plus sensibles à une lyse rapide après extraction ou pour permettre une bonne conservation des axones et de la myéline [21] [22] [23] [24] [25] [26].

- Les fixatifs

Un mélange de glutaraldéhyde (Ga) et de paraformaldéhyde (PFA) est recommandé pour les études d'ultrastructure dans la mesure où le Ga a une grande capacité à réticuler et que le PFA agit rapidement [23] [24] [25] [26] [27] [28]. L'article originel écrit par Karnovsky [29] recommande un mélange de 5% de Ga et 4% de PFA, ce qui correspond à des concentrations bien plus élevées que ce qui actuellement utilisé [28]. D'autres personnes ont déterminé empiriquement des mélanges qui sont utilisés à la fois pour les études structurales et immunocytochimiques et qui consistent en une solution de Karnovsky modifiée : 2% PFA et 2.5% Ga dans une solution tampon de cacodylate sodium 0.1M (ou solution phosphate avec un pH de 7.4) [30]. Le mélange optimal

de Ga et PFA est difficile à déterminer car les interactions chimiques de ces deux fixatifs l'un avec l'autre et avec le tissu sont encore mal connues [31].

Une faible pénétration du fixatif dans le tissu entraînera une mauvaise fixation au centre. Une large gamme de concentrations de Ga (1.5-4%) a été utilisée dans la fixation de tissus animaux [28]. En général, une concentration faible de fixatifs requière une durée de fixation plus longue, mais une longue fixation au Ga (plus d'une semaine) peut causer une contraction ou *shrinkage* du tissu [28]. De fortes concentrations (>4%) ne sont pas recommandées non plus puisqu'elles entraînent des dommages de l'ultrastructure [32]. La présence du Ga affecte le processus de réticulation des protéines et l'osmolarité. De hautes concentrations de Ga (30% et plus) peuvent entraîner l'extraction des composants cellulaires si l'osmolarité n'est pas contrôlée [30]. Une osmolarité non adaptée au tissu cause la contraction ou *shrinkage*, le gonflement ou *swelling* de la structure axone/myéline.

D'autres fixatifs, moins courants, peuvent être utilisés tels que l'acroléine et le tétr oxyde d'osmium, ce dernier étant utilisé comme colorant.

Le tableau 2.2 liste les différents protocoles utilisés dans la littérature pour préparer le tissu nerveux.

- Durée de la fixation

La pénétration du fixatif dans le tissu est décrite par le seconde loi de Fick [33] [34] :  $\frac{\partial c_i}{\partial t} = D \frac{\partial c_i}{\partial x}$ , ou  $i$  est le fixatif considéré,  $c_i$  la concentration du fixatif,  $x$  l'axe de pénétration,  $t$  le temps de pénétration du fixatif et  $D$  le coefficient de diffusion du fixatif. En considérant que le volume de la solution de fixatif est assez élevé et que la concentration nominale  $c_0$  de la solution reste inchangée à la limite du tissu, la concentration de fixatif peut s'écrire :

$$c_i(x, t) = c_0 \left( 1 - \operatorname{erf} \left( \frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right) \right) \approx c_0 \left( 1 - \frac{x}{\sqrt{Dt}} \right) \quad (1)$$

Si on définit  $d$ , la profondeur de pénétration à laquelle 50% de la concentration nominale ( $c_i(d, t) = 1/2c_0$ ) est obtenue, on peut écrire :  $d \approx 1/2\sqrt{Dt}$ .

Le coefficient de diffusion  $D$  est influencé par la température ( $T$ ), la viscosité du fluide ( $\eta$ ), la taille des composants chimiques ( $r$ ) selon la loi Stokes-Einstein pour les solutions à faibles nombres de



Reynolds :  $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$  où  $k_B$  est la constante de Boltzmann [35]. Ainsi, une température élevée, une solution à faible viscosité et de petits composants chimiques augmenteront le taux de diffusion.

Les valeurs de diffusion du tétroxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ), du Ga et du formaldéhyde sont respectivement  $D = 0.2, 0.34$  and  $2.0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  [36]. Ainsi, en utilisant  $d \approx 1/2\sqrt{Dt}$ , à température ambiante, Ga et PFA pénètrent le tissu à une profondeur respective de 1 mm et 3 mm après 4h, ou de 3 mm et 7 mm après 24h.

En ce qui concerne la pénétration de l'osmium, la réaction avec les lipides insaturés réduit drastiquement la perméabilité des membranes et ainsi la diffusion à travers le tissu. La coloration par l'osmium est ainsi fortement réduite après 200  $\mu\text{m}$ . Plusieurs stratégies ont été développées pour améliorer la pénétration de l'osmium, en réduisant la température durant le processus d'osmification ou/et en utilisant un agent réducteur pour améliorer le contraste [37] [38].

Tableau 2-2 : Les différents protocoles histologiques trouvés dans la littérature pour différentes espèces.

Espèces	Perfusion	Immersion	Osmification	Autres colorations	Références
Singe	2% Ga – 2% PFA				[39]
	1% Ga – 1% PFA	1% Ga – 1% PFA	OsO <sub>4</sub> 1% (1.5h)	1% bleu de toluidène (OM) 1% acétate uranyle et 1% acétate de plomb (EM)	[40]
Chat	1.5% Ga – 1% PFA – 0.1% acide picrique	1.5% Ga – 1% PFA – 0.1% acide picrique	OsO <sub>4</sub> 1% - 1.5% ferricyanure de potassium	1% acétate uranyle et 0.1% citrate de plomb ??	[41]
Rat	0.5% PFA – 1.5% Ga – 0.1% acide picrique	0.5% PFA – 1.5% Ga – 0.1% acide picrique	OsO <sub>4</sub> 2% - 0.15% ferricyanure de potassium (EM)	5% bleu de toluidène (OM) acétate uranyle et citrate de plomb (EM)	[42]
	0.5% Ga – 4% PFA	0.5% Ga – 4% PFA (2 <sup>nd</sup> animal)	OsO <sub>4</sub> 2% (1 <sup>er</sup> animal) OsO <sub>4</sub> 4% - 1.5% ferricyanure de potassium (2 <sup>nd</sup> animal)	Méthylène bleu-azure II (1 <sup>er</sup> animal) Méthylène bleu-azure II (OM) ou 4% acétate uranyle et 11.6% acétate de plomb (EM) (2 <sup>nd</sup> animal)	[43]
Humain	10% formaline (3.7–4.0% formaldéhyde) à travers l'artère fémorale	10% formalin 5% dichromate de potassium et 5% chromate de potassium		Bleu Luxol rapide, hématoxyline (LPH)	[44]

- Les solutions tampons

La qualité de la fixation est influencée par le type de solution tampon, i.e. par son pH et les ions présents dans la solution.

Le choix de la solution tampon est basé sur : (i) sa capacité à maintenir un pH constant pendant les étapes de la fixation du tissu, (ii) une osmolarité adaptée pour prévenir les artefacts de fixation (*swelling* et *shrinkage*), (iii) une concentration ionique adaptée pour prévenir l'extraction des composants cellulaires et la précipitation pendant la fixation, et (iv) sa toxicité.

Ainsi, les critères d'une bonne solution tampon sont : (i) un pKa compris entre 6 et 7 pour les tissus biologiques, (ii) une grande solubilité dans l'eau, (iii) peu d'effets ioniques, (iv) sa composition en ions, (v) sa résistance à l'oxydation (stabilité), (vi) pas de réaction avec les fixatifs, et (vii) son faible coût et la facilité de sa préparation.

Les solutions tampons les plus utilisés sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2-3 : Les différents types de solutions tampons pour les études histologiques.

Solutions tampons	Avantages	Inconvénients
Phosphate (Sorensen)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- le plus utilisé</li> <li>- non toxique pour les cellules</li> <li>- le pH varie peu avec la température stable pendant plusieurs semaines à 4°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- plus susceptible de précipiter pendant la fixation</li> <li>- tend à précipiter en présence d'ions calcium</li> <li>- précipite l'uranyle acétate</li> </ul>
Cacodylate (arsenate)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- stable pour une longue période</li> <li>- peu de précipitation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- toxique : contient de l'arsenic</li> </ul>
Veronal-acétate (Michaelis)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pas de précipitation</li> <li>- utile pour la coloration avec l'uranyle acétate</li> <li>- stable pendant plusieurs mois à 4°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- réagit avec les aldéhydes</li> <li>- contient du barbiturate</li> </ul>
Colidine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- stable à température ambiante</li> <li>- aide à la pénétration du fixatif dû à ses effets extractifs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- non approprié durant la post-fixation avec le tétr oxyde d'osmium dû à l'extraction des constituants du tissu</li> <li>- lyse de la matrice cytoplasmique et destruction massive de la membrane quand il est utilisé avec du PFA</li> </ul>
Tris	<ul style="list-style-type: none"> <li>- plus ou moins inerte physiologiquement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- le pH change avec la température</li> </ul>

- Osmolarité des solutions

L'osmolarité se définit par le nombre de particules osmotiquement actives par litre de solution, i.e. le nombre de moles en solution intervenant dans la pression osmotique qui s'exerce sur une membrane lorsqu'il y a un phénomène d'osmose (Figure 2-7).

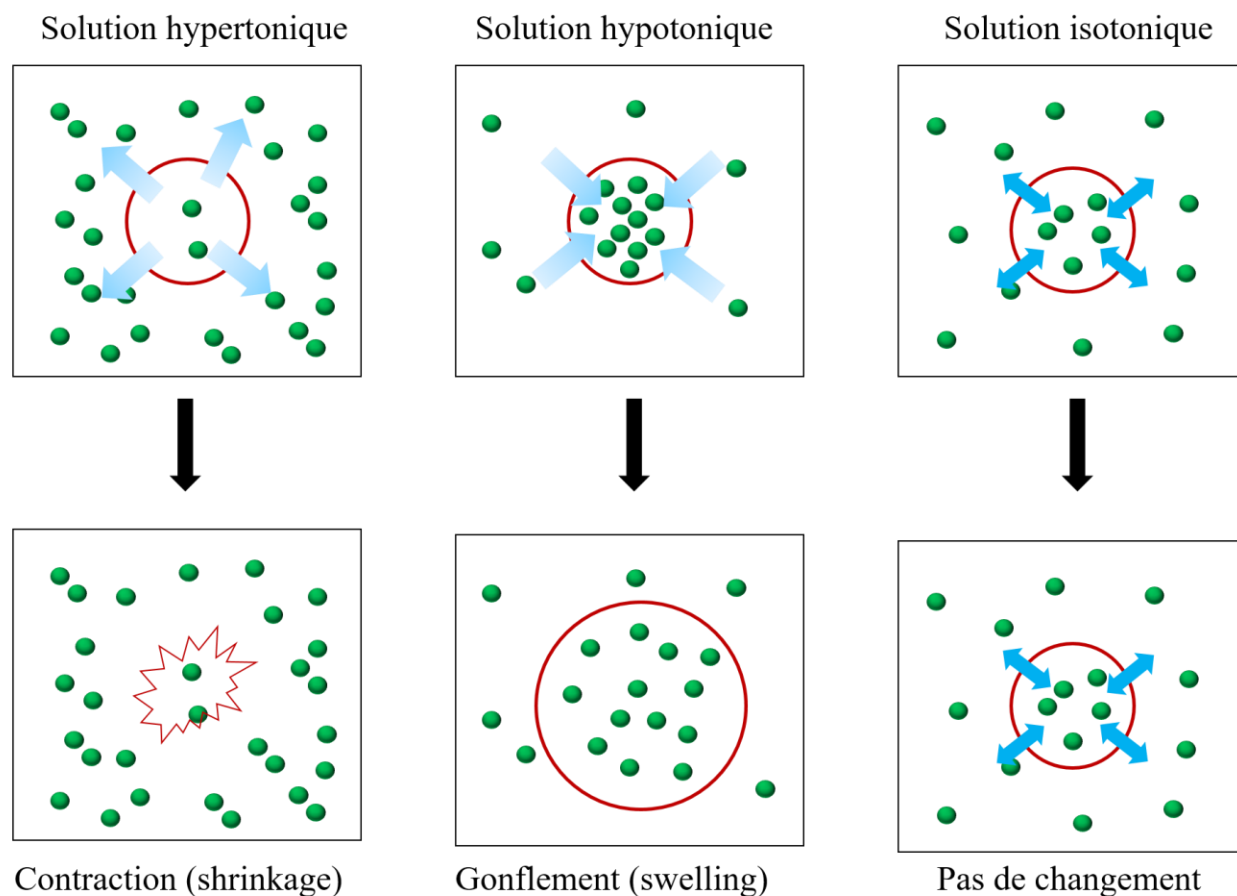


Figure 2-8 : Osmolarité d'une solution et son effet sur la membrane plasmique de la cellule (en rouge). Les flèches indiquent la direction dans laquelle l'eau se déplace via l'osmose.

L'osmolarité de la solution de fixatif a un effet direct sur la morphologie de la myéline. La taille et la forme de l'axone peuvent être affectées par l'osmolarité de la solution tampon et la solution de fixatif. L'osmolarité dépend du type de tampon et de la concentration des fixatifs [45]. L'osmolarité de la solution de fixatif devrait être légèrement hypertonique (400-600 mOsmol) [25]. L'hypertonie empêche les vaisseaux sanguins d'exploser pendant la perfusion [25]. Une osmolarité élevée (>1000 mOsmol) peut induire une contraction ou *shrinkage* du tissu et un élargissement de l'espace extracellulaire [46]. Une osmolarité faible ( $\leq 320$  mOsmol) entraîne une

mauvaise fixation; le flux de fixatifs, durant la perfusion, cesse rapidement à travers le spécimen dû à une augmentation de la résistance durant la procédure [45]. Des agents chimiques tels que des électrolytes,  $\text{CaCl}_2$  permettent de rectifier l'osmolarité d'une solution isotonique et ainsi diminuer les artefacts de fixation (*swelling* et *shrinkage*) [28]. Pour augmenter l'osmolarité, on peut ajouter à la solution de fixatifs du saccharose ou de l'acide tanique [28].

- Température et pH des solutions

A de faibles températures, le taux de pénétration, ainsi que la réaction des fixatifs, sont diminués, ce qui affecte la perméabilité des membranes cellulaires. A de hautes températures, des changements autolytiques se produisent plus rapidement [47] ce qui cause l'apparition d'artefacts de fixation (*swelling*, *shrinkage* de la membrane cellulaire) [28]. Certains chercheurs ont démontré que la fixation au formaldéhyde à température ambiante induit une mauvaise préservation [48]. Cependant, dépendamment du type de tissu, Ga peut être utilisé à des températures comprises entre 0 et 25°C entraînant peu de modifications morphologiques dans l'ultrastructure [28]. Durant la perfusion, de faibles températures affectent les processus métaboliques et peuvent induire la perte des structures cellulaires [28]. Durant une perfusion vasculaire, l'utilisation du Ga en dessous de la température corporelle peut causer la vasoconstriction des cellules [25].

De plus, quand les cellules meurent pendant la fixation, les lysosomes relarguent leur contenu et rendent le pH du tissu acide. Le pH optimal est un pH physiologique (7.4) ; proche de celui du tissu et doit être maintenu durant toute la préparation du tissu. En effet, un changement dans le pH du tissu peut sévèrement altérer l'ultrastructure. Il est recommandé d'ajuster le pH des solutions de préparation entre 7.2-7.5 [49].

### 2.2.1.2 Coloration du tissu

Il existe différents colorants tissulaires, tels que l'hématoxyline, l'éosine, le violet de crésil, le permanganate de potassium, les sels d'uranium ou encore le tétr oxyde d'osmium. Ces colorants permettent d'améliorer le contraste de l'image en microscopie. Avant l'osmification le tissu doit être rincé avec la solution tampon pour éviter toute réaction chimique entre les fixatifs et le tétr oxyde d'osmium [20].

Le tétr oxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ) agit comme un second fixatif [50]. Il possède deux propriétés intéressantes : il fixe les lipides et colore les membranes cellulaires pour les microscopies optique

et électronique. Sans l'osmium, les lipides sont dissous durant l'étape de déshydratation [30] [31] [51] [52] [53] [54]. En microscopie électronique, l'osmium améliore la densité des électrons rétrodiffusés dû à son numéro atomique élevé ( $Z=76$ ) et la conductivité de l'échantillon [32]. Comme vu au-dessus, l'osmium a une faible profondeur de pénétration, c'est pourquoi il est recommandé de couper son échantillon en plusieurs petits morceaux pour faciliter la pénétration ou d'imager seulement la surface de son échantillon ( $<200\mu\text{m}$ ).

### **2.2.1.3 Déshydratation du tissu**

Avant d'enrober le tissu dans la résine il est nécessaire de déshydrater l'échantillon dans des solvants tels que l'acétone, l'éthanol et l'oxyde de propylène. Le but de la déshydratation est d'extraire l'eau du tissu pour que la solution d'enrobage puisse s'infiltrer dans le tissu.

La déshydratation consiste en une série de bains d'acétone de concentrations graduelles qui permet d'avoir moins de fragmentation de la myéline [55].

Certains manuels de microscopie électronique suggèrent que l'éthanol couplé à l'oxyde propylène permet une meilleure infiltration que l'acétone [32] [31]. Cependant l'acétone semble causer moins de contraction (*shrinkage*) cellulaire que l'éthanol [30] [56].

### **2.2.1.4 Enrobage du tissu**

Une fois que le tissu est déshydraté, il est enrobé pour l'observation au microscope. Les résines acryliques sont plus dures que la paraffine, ainsi elles permettent de couper des sections plus fines que la paraffine ( $0.1\text{-}2\ \mu\text{m}$  vs  $3\text{-}6\ \mu\text{m}$ ), permettant ainsi une meilleure résolution pour la microscopie optique [57] [58] [59]. Pour couper les blocs de résine, des lames de diamant peuvent être utilisées (sections  $<100\ \text{nm}$ ) pour la microscopie électronique à transmission.

Les résines époxy sont les plus utilisées pour la microscopie électronique. Ces résines sont recommandées pour les études morphologiques mais ne sont pas conseillées pour les études immunocytochimiques. Le choix du type d'époxy est déterminé par sa dureté, sa viscosité, et sa résistance sous le faisceau d'électrons. Embed 812 est une résine époxy standard qui satisfait les critères mentionnés plus haut.

## 2.2.2 Microscopie

Plusieurs techniques de microscopie ont été utilisées pour imager l'ultrastructure de la matière blanche.

La plupart des validations des travaux IRM sur l'imagerie de la myéline ont principalement été menées avec des techniques de transmission lumineuse sur des tissus colorés au bleu de Luxol rapide par exemple. Cependant ce type de coloration est limité par sa valeur quantitative ; une faible atténuation est corrélée avec la quantité de myéline mais ne fournit pas de mesure de la densité de myéline. Cette coloration est sujette à quelques biais; telle qu'une pénétration inhomogène de la coloration dans le tissu, et ne permet pas de quantifier la microstructure tels que la distribution du diamètre axonal ou l'épaisseur de la myéline.

Les méthodes de préparation de tissu n'ont pas fondamentalement changées depuis les années 1960. Cependant des techniques récentes ont été introduites et améliorent l'état de l'art actuel sur la morphométrie axonale de la matière blanche de la moelle épinière. Dans cette sous-partie, différents types de microscopie impliqués dans l'observation de la microstructure de la matière blanche sont énumérés et comparés entre eux (les techniques les plus pertinentes pour notre étude sont plus détaillées).

Le Tableau 2-4 liste les différents types de microscopies utilisées pour observer la microstructure de la matière blanche de la moelle épinière.

### 2.2.2.1 Microscopie optique (MO)

- Microscopie optique classique

Le microscope optique ou photonique est un système optique à lentilles qui permet d'agrandir l'échantillon observé.

La résolution d'un microscope désigne sa capacité à séparer des détails très voisins. La limite de résolution d'un microscope photonique classique est d'environ 0,2  $\mu\text{m}$  (Figure 2-8, Source : [60]).

De plus, la microscopie optique permet aussi de révéler les oligodendrocytes si l'on utilise des colorations immunohistochimiques, en faisant appel à des techniques de transgénèse, permettant d'induire la synthèse de protéines fluorescentes chez les animaux telle que la *green fluorescent protein (GFP)*, dans les tissus cibles.

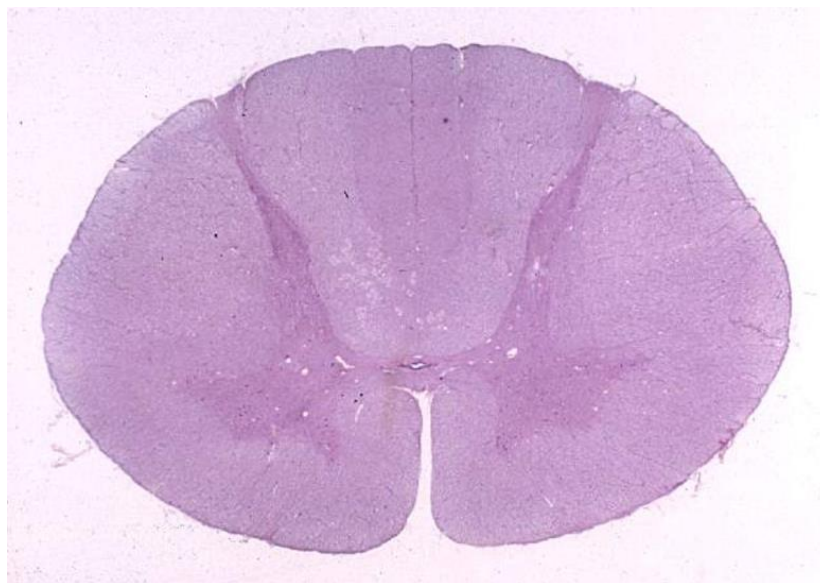


Figure 2-9 : Segment cervical de la moelle épinière en microscopie optique [60].

- Microscopie Raman stimulée (CARS)

L'observation des axones et de la myéline repose sur les techniques conventionnelles de préparation mentionnées plus haut. Cependant, la préservation de l'ultrastructure des axones/myéline est fortement sensible aux artefacts de fixation. C'est pourquoi, de nouvelles techniques d'imagerie de la myéline ont été développées ces dernières décennies et peuvent être utilisées sans fixer le tissu ou immunocoloration [61] [62] [63].

La microscopie Raman stimulée (CARS *Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy*) rivalise avec la microscopie à fluorescence classique et permet d'imager la myéline [62] [64]. Les résolutions axiale et latérale du CARS sont respectivement 0.70 et 0.28 nm [62]. Le CARS ne nécessite pas l'utilisation de tissus colorés et déshydratés/enrobés (étapes critiques de la fixation les plus susceptibles d'endommager le tissu) grâce au contraste chimique endogène provenant des lipides de la myéline. Cela permet ainsi d'avoir des mesures plus réalistes de l'épaisseur de la myéline [62] [64] [65]. De plus, cette technique permet d'imager la myéline *in vivo*, permettant par exemple de suivre la démyélinisation dans les modèles animaux de maladies neurodégénératives [66] [67] [68]. Un exemple d'image CARS est donné à la Figure 2-9 (Source : [69]).



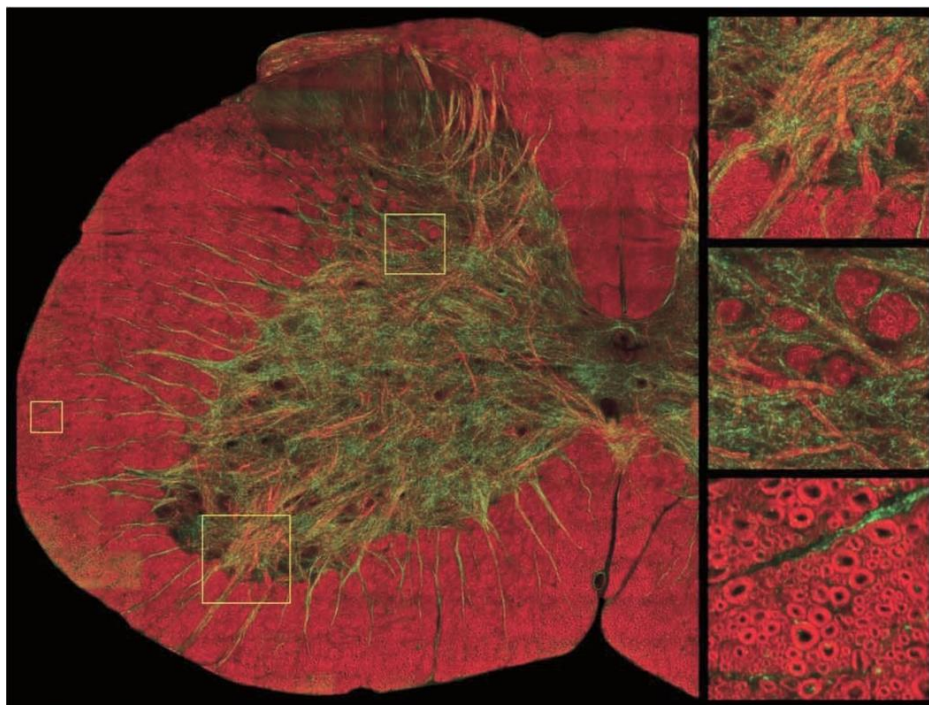


Figure 2-10 : Image CARS d'une section de moelle épinière [69].

- Microscopie de localisation par photoactivation (PALM)

La microscopie PALM (*Photo-activated Localization microscopy*) est une microscopie à fluorescence en champ large permettant d'avoir une résolution de l'ordre de 15-20 nm. Cette technique a été développée par Eric Betzig en 2006 qui a remporté le prix Nobel de chimie en 2014 pour ce travail. Elle repose sur un marquage sélectif de l'échantillon avec des fluorophores. Le contraste augmente avec la densité de fluorophores et les molécules auxquelles sont attachés ces fluorophores émettent une par une de la lumière, ce qui permet de séparer les photons venant de chaque émetteur. Elle permet de dépasser la limite de diffraction pour atteindre des résolutions de l'ordre de 20 nm.

- Microscopie déplétion par émission stimulée (STED)

Le STED (*Stimulated Emission Depletion Microscopy*) est une microscopie de fluorescence à balayage qui permet d'avoir une super résolution. Elle permet de dépasser la limite de résolution imposée par la diffraction. L'émission stimulée (désexcitation d'un électron) permet de réduire la zone d'émission des fluorochromes; seul le centre de la zone excitée reste fluorescent.

- Microscopie par reconstruction stochastique optique (STORM)

La microscopie STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) est basée sur le même principe que la microscopie PALM mais n'utilise pas le même type de fluorophore.

### 2.2.2.2 Microscopie électronique (ME)

En coupe transversale, la gaine de myéline apparaît comme un empilement de couches concentriques autour de l'axone séparées entre elles par des cercles sombres denses en électrons.

- Microscopie électronique à transmission (MET)

Le MET consiste à placer un échantillon suffisamment mince (moins de 100 nm) sous un faisceau d'électrons. L'image est formée par l'interaction des électrons avec l'échantillon. Une lentille magnétique permet de former l'image de l'objet et le jeu de lentilles permet de former une image agrandie et focalisée. Elle permet d'avoir une très bonne résolution de l'ordre de 0.08 nm (Figure 2-10, Source [70]).

Le MET est un outil analytique majeur en physiologie; il s'agit du type de microscope le plus utilisé dans les études histologiques.

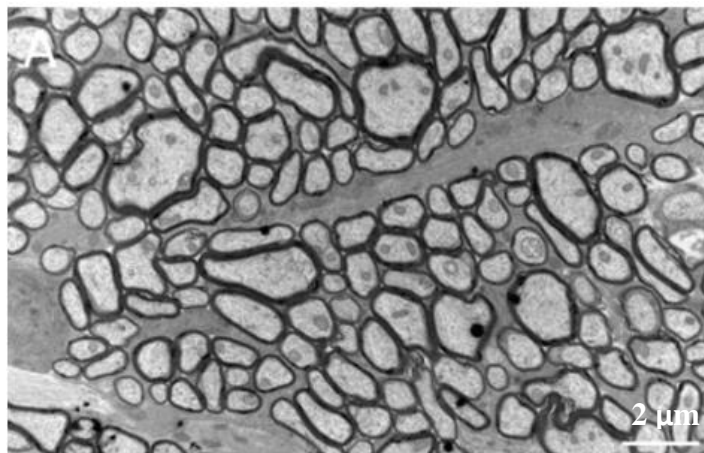


Figure 2-11 : Image MET d'axones de nerfs optiques de souris, échelle 2 µm [70].

- Microscopie électronique à balayage (MEB)

Le MEB est composé d'une source d'électrons qui accélère les électrons de l'échantillon, d'un système de lentilles pour permettre le focus des électrons en un faisceau d'électrons, d'une fente pour converger le faisceau, une lentille pour diriger le faisceau d'électrons en une fine sonde, des

bobines de déflexion pour balayer l'échantillon avec le faisceau d'électrons et des détecteurs qui détectent les signaux générés par les interactions entre le faisceau d'électrons et l'échantillon.

Il existe trois grandes familles de canons à électrons dans un MEB : (i) les canons conventionnels et l'émission des électrons par effet thermoélectrique (filament W et pointe LaB6), et les canons à effet de champ; (ii) les cathodes dites chaudes et l'émission des électrons par effet Schottky (pointe Schottky), (iii) les cathodes dites froides et l'émission des électrons par effet tunnel (cathode froide). Ces deux derniers canons constituent le MEB-FEG (FESEM). Les performances et le confort d'utilisation du MEB-FEG sont plus élevés que ceux du MEB conventionnel.

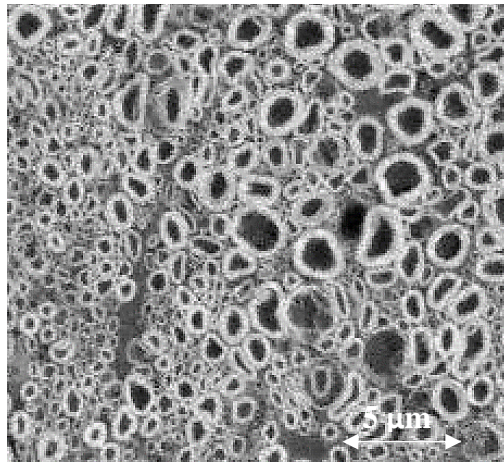


Figure 2-12 : Image MEB d'axones de la matière blanche de moelle épinière chez le rat.

Tableau 2-4 : Comparaison des différentes techniques d'imagerie de la microstructure de la matière blanche de la moelle épinière.

Microscope		Résolution	Caractéristiques
MO	Microscope optique classique	0.2 $\mu\text{m}$	Échantillon traversé par les rayons lumineux
CARS	Coherent Anti-Stokes Raman Microscopy	0.70 nm (axiale) 0.28 (latérale)	Sensible à la nature biochimique du tissu
OCM	Optical Coherence Microscopy	1.15 $\mu\text{m}$ (axiale) 0.5 $\mu\text{m}$ (latérale)	Utilise comme CARS la lumière rétrodiffusée due aux variations de l'indice de réfraction dans le tissu comme source de contraste endogène
STED	Stimulated Emission Depletion	50 nm	Acquisition rapide Restrictions de fluorophores
PALM	Photo-Activated Localization Microscopy	15 nm	Haute résolution. Acquisition longue. Requièr des isoformes GFP photo-activable
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy	15 nm	Haute résolution. Acquisition longue
TEM	Transmission Electronic Microscopy	0.08 nm	Champ de vision restreint
SEM	Scanning Electron Microscopy	Entre 0.4 et 20nm	Les électrons balaient la surface de l'échantillon

A la lumière de la revue de littérature, toutes les études portées sur la mesure de la microstructure de la moelle épinière utilisent une section partielle de leur échantillon (souvent 1 à 6% de la surface du tract analysé). Dans la mesure où des échantillonnages partiels peuvent introduire une variabilité et une erreur, en plus de ne pas être représentatifs de l'échantillon entier, l'analyse de la section complète est nécessaire [71].

### **2.2.3 Mesures morphologiques des fibres nerveuses dans la littérature**

La matière blanche de la moelle épinière est composée de plusieurs tracts ou faisceaux d'axones, chacun ayant un rôle dans le SNC. Et en fonction de la région où l'on se trouve dans la matière blanche, le diamètre et la densité axonale, l'épaisseur de myéline, le g-ratio sont différents. Chacun de ces tracts peuvent être affectés dans les cas de pathologies neurologiques, et c'est pourquoi, il est important de les caractériser individuellement. Les méthodologies visant à identifier les tracts seront explicitées dans la partie 2.3.

Comme vu au-dessus, la matière blanche de la moelle épinière présente deux catégories de tract : les tracts ascendants et descendants. D'une espèce à une autre le nombre et le type de tract est différent. Les tracts descendants interviennent dans le système moteur latéral dit corticospinal tel que le tract rubrospinal, dans le système moteur médian avec les tracts reticulospinal et vestibulospinal. Ces trois tracts jouent un rôle dans le contrôle moteur. Les tracts ascendants sont localisés dans la colonne dorsale qui contient les tracts fasciculus gracilis, fasciculus cuneatus, spinothalamic, spinocerebellar et spinoreticular. Ces tracts ont pour but de transmettre l'information sensorielle telle que la proprioception [13].

Le tract pyramidal, qui désigne les axones du tract corticospinal, est le plus étudié. Cependant il existe des confusions dans la terminologie employée pour désigner ce tract.

Janos A. Perge et al [8], en 2012, ont réalisé une étude sur différents modèles animaux (cochon dinde, rat, singe, octopus) et ont trouvé que : (i) les petits axones sont plus nombreux que les gros axones, (ii) la distribution du diamètre axonal au sein d'un tract est hétérogène.

Dans cette sous-partie, l'objectif est de répertorier, dans la littérature, les valeurs calculées pour ces quatre métriques (diamètre axonal, densité axonale, épaisseur de la gaine de myéline, g-ratio) chez le rat.

### 2.2.3.1 Axones myélinisés et non myélinisés

Dans les articles consultés pour répertorier les données microstructurales de la matière blanche, nombreux sont les auteurs qui n'explicitent pas la terminologie employée pour désigner le mot fibre. Il ne mentionne pas si les fibres réfèrent à des fibres myélinisées ou à toutes les fibres (myélinisées et non myélinisées).

Depuis les années 1980, de nombreux chercheurs ont observé la présence de nombreux axones non myélinisés dans la matière blanche [21] [42] [43] [72] [73]. Mais très peu d'entre eux ont reporté les mesures morphométriques de ces fibres. De plus, ces études pourraient surestimer le nombre des fibres non myélinisés en confondant ces fibres avec les cellules gliales [39].

Environ 12% des fibres du tract corticospinal sont non myélinisées [74], et on en trouve 60% dans le tract pyramidal [39]. La portion cervicale du tract corticospinal présente 35 000 fibres non-myélinisées, alors que le niveau médullaire du tract pyramidal en possède 140 000 [42] [72]. Cette différence s'explique par le fait que les projections corticobulbaires se terminent dans le cortex cérébral.

On peut noter que contrairement chez le rat, le singe présente très peu d'axones non-myélinisés (<1%) dans le tract pyramidal [39].

### 2.2.3.2 Diamètre axonal

Les mesures du diamètre axonal dans la matière blanche représentent un grand intérêt pour l'étude de la fonction du système neuronal à la fois en recherche et dans les applications cliniques. La vitesse de conduction, dans les fibres nerveuses saines et myélinisées, est directement proportionnelle au diamètre axonal [75]. Dans de nombreux troubles neurologiques acquis ou innés, le dommage axonal est dépendant de la taille de l'axone [76]. Par exemple les axones ayant un diamètre plus petit que 3.3  $\mu\text{m}$  semblent être plus affectés dans la sclérose en plaques que les plus gros axones [77]. De plus, chez des rats ayant subi une lésion axonale diffuse, des dommages axonaux tel que le renflement axonal ou *axonal swelling* ont été observés et corrélés au temps de survie de l'animal, et il a été montré que le diamètre moyen de ces axones endommagés dépend de la sévérité de la lésion infligée [78].

C'est pourquoi, cartographier le diamètre axonal à chaque niveau vertébral permet non seulement de fournir une connaissance importante sur la pathophysiologie du tissu neuronal, mais aussi de

faciliter très tôt le diagnostic, l'évaluation et la prédiction de la progression des maladies neurodégénératives.

Le fasciculus gracilis (FG) dans la colonne dorsale de la moelle épinière contient principalement des petits axones, alors que le tract corticospinal dans les colonnes latérale et ventrale contient un mixte de gros et petits axones [79]. De plus, les plus petits axones sont observés dans le tract dorsal corticospinal (dCST) et les plus gros dans le tract Reticulospinal (ReST) et le tract vestibulospinal (VST), variant de 1,4 à 4,9  $\mu\text{m}$  [80].

Dans le Tableau 2-5. on peut trouver les différentes valeurs de diamètre axonal données par la littérature chez le rat.

Tableau 2-5 : Valeurs de diamètre axonal dans la matière blanche de moelle épinière chez le rat dans les tracts dorsal corticospinal (dCST), fasciculus gracilis (FG), fasciculus cuneatis (FC), Reticulospinal (ReST), rubrospinal (RST), spinothalamic (STT), vestibulospinal (VST).

Nom du tract	Niveau	Diamètre axonal ( $\mu\text{m}$ )		Référence
		Avec myéline	Sans myéline	
dCST			Moyen : 1.43 $\pm$ 0.27 Minimum : 1.11 Maximum : 1.95	[80]
	Cervical	Moyen : 1.27 $\pm$ 0.15		[81]
			Moyen : 1.12 $\pm$ 0.42	[82]
		Moyen : 1.16 $\pm$ 0.10		[83]
FG			Moyen : 2.29 $\pm$ 0.26 Minimum : 1.79 Maximum : 2.57	[80]
	Cervical	Moyen 1.73 $\pm$ 0.22		[81]
	Cervical		Moyen : 1.74 $\pm$ 0.60	[82]
		Moyen : 1.80 $\pm$ 0.13		[83]
FC			Moyen : 3.39 $\pm$ 0.67 Minimum : 2.56 Maximum : 4.31	[80]
	Cervical	Moyen : 3.52 $\pm$ 0.36		[81]
		Moyen : 3.73 $\pm$ 0.36		[83]
ReST			Moyen : 4.09 $\pm$ 0.49 Minimum : 3.35 Maximum : 4.75	[80]

	Cervical	Moyen : 2.72±0.36	[81]
		Moyen : 2.22±0.21	[83]
RST		Moyen : 2.66±0.49 Minimum : 2.16 Maximum : 3.47	[80]
	Cervical	Moyen : 3.06±0.37	[81]
	Cervical	Moyen : 1.98±1.04	[82]
		Moyen : 3.39±0.47	[83]
STT		Moyen : 2.53±0.59 Minimum : 1.83 Maximum : 3.34	[80]
VST		Moyen : 3.43±0.44 Minimum : 2.83 Maximum : 4.24	[80]
	Cervical	Moyen : 5.54±0.36	[81]
	Cervical	Moyen : 2.74±1.88	[82]
		Moyen : 4.47±0.51	[83]

Ce que l'on peut remarquer en parcourant ce tableau est la variabilité du diamètre axonal d'une étude à une autre. Par exemple, pour le VST, Xu et al. [81] mesurent un diamètre axonal moyen de 5.54±0.36 µm alors que Nunes et al. [80] mesurent un diamètre axonal de 3.43±0.44 µm.

On peut noter comme tendance que le diamètre axonal est différent d'un tract à l'autre.

Les variations pourraient être dues à un rétrécissement ou *shrinkage* des axones en fonction des protocoles histologiques utilisés pour fixer le tissu. Elles pourraient aussi être liés à une variabilité inter-rat ou au fait que le gaine de myéline est prise en compte ou pas.

### 2.2.3.3 Densité axonale

La densité axonale correspond au nombre d'axones dans la surface analysée. Dans le tableau ci-dessous elle est exprimée en nombre d'axones/mm<sup>2</sup>.



Tableau 2-6 : Valeurs de densité axonale dans la matière blanche de moelle épinière chez le rat dans les tracts dorsal corticospinal (dCST), fasciculus gracilis (FG), fasciculus cuneatis (FC), Reticulospinal (ReST), rubrospinal (RST), vestibulospinal (VST).

Nom du tract	Niveau	Densité axonale (nb d'axone/mm <sup>2</sup> )	Référence
dCST	Cervical	Moyenne : 344,000±41,000	[81]
FG		Moyenne : 189,000±49,000	
FC		Moyenne : 93,000±23,000	
ReST		Moyenne : 133,000±24,000	
RST		Moyenne : 100,000±32,000	
VST		Moyenne : 65,000±16,000	

#### 2.2.3.4 Épaisseur de la gaine de myéline

L'épaisseur de la gaine de myéline est un paramètre qui suscite un grand intérêt dans la morphométrie de la moelle épinière. L'utilisation du g-ratio est une manière de la déterminer.

Tableau 2-7 : Valeurs de l'épaisseur de la gaine de myéline dans la matière blanche de moelle épinière chez le rat. Tract dorsal corticospinal (dCST), fasciculus gracilis (FG), rubrospinal (RST), vestibulospinal (VST).

Nom du tract	Niveau	Épaisseur de la gaine de myéline (µm)	Référence
dCST	Cervical	Moyenne : 0.38±0.14	[82]
FG		Moyenne : 0.59±0.21	
RST		Moyenne : 0.84±0.33	
VST		Moyenne : 1.25±0.52	

### 2.2.3.5 G-ratio

Le g-ratio est une propriété microstructurale fondamentale de la matière blanche et fut introduit pour la première fois par Donaldson et Hoke (1905). Le g-ratio est reconnu pour déterminer le degré de myélinisation axonale. Il est défini par le ratio entre le diamètre axonal interne de la fibre et le diamètre axonal externe (fibre plus gaine de myéline). La vitesse de conduction des impulsions électriques est maximale avec un g-ratio de 0.6 à 0.7 [42] [79] [84]. Cependant ce n'est pas une règle générale. Par exemple, pour des diamètres axonaux élevés, la valeur du g-ratio tend à augmenter [41] [79]. De plus, plusieurs études ont reporté des variations dans le degré de myélinisation des axones ayant le même diamètre : pour les plus petits axones la gaine de myéline pourrait être trois à quatre fois plus épaisse que les gros axones [43] [85].

Des variations du g-ratio ont été reportées dans les études histologiques menées sur le développement du cerveau et des maladies neurodégénératives. Cependant il est difficile de le mesurer de manière non invasive in vivo.

### 2.2.3.6 Sources de variabilité

Plusieurs facteurs pourraient être impliqués dans la variabilité élevée entre les différentes études. Il est essentiel de les prendre en compte pour établir les tendances dans la morphométrie des axones. Par exemple, il a été montré que le poids influe sur le nombre de fibres dans les pyramides à travers les espèces, et pourrait accentuer la variabilité inter-sujet du tract corticospinal [86] [87].

- Le sexe

Des études sur des jeunes rats ont montré que les mâles présentaient un volume total de fibres myélinisées et une épaisseur de myéline supérieurs à celui des femelles [88]. Toujours d'après cette étude, ces paramètres diminuent de manière significative avec l'âge chez le mâle, alors que ces paramètres augmentent avec l'âge chez la femelle. Aucune différence pour le diamètre moyen des fibres myélinisées ne fut observée entre les deux sexes. Ils ont alors émis l'hypothèse que l'augmentation du diamètre moyen des fibres serait due à la perte des plus petits axones. Chez les femelles, l'augmentation de l'épaisseur de la myéline pourrait être expliquée par les divisions de la lamellae de la myéline, à cause d'une espérance de vie des oligodendrocytes plus courte. De la même manière, un autre groupe de recherche a montré que le diamètre axonal diminuait chez le mâle [89].

Chez la souris, au niveau cervical, Cerghet et al. (2006) ont trouvé des plus petits oligodendrocytes et moins de protéines basiques de la myéline (MBP) chez les femelles, suggérant un degré de myélination moindre chez les femelles [90].

Un dimorphisme sexuel a déjà été mis en évidence dans le cerveau, plus précisément dans l'hippocampe, donc, même si cette issue n'a pas été beaucoup traitée dans la moelle épinière, on peut supposer avoir un dimorphisme sexuel dans la moelle [91]. Par exemple, le niveau sacral de la moelle épinière est différent chez les mâles et les femelles; les mâles possèdent des motoneurones supplémentaires dans la matière grise pour contrôler les muscles bulbocaverneux qui interviennent dans l'éjaculation [91] [92] [93].

D'autres chercheurs ont montré un dimorphisme sexuel des astrocytes et neurones dans le cerveau et la moelle épinière [94] et que la densité des oligodendrocytes dans la moelle épinière de rat mâle est plus grande que chez les femelles [90]. Les hormones sexuelles endogènes pourraient contribuer au dimorphisme sexuel. Les femelles ont plus de fibres non myélinisées que les mâles [95]. Il est possible que les hormones stéroïdes augmentent l'expression des protéines de la myéline dans le CNS [96] [97].

Ces études révèlent que les hormones ne modèleraient non seulement le système immunitaire mais montrent comment les cellules gliales contribuent aux différences observées dans les phénotypes pathologiques entre les mâles et femelles atteints par la sclérose en plaques.

Le groupe de chercheur qui a montré que les volumes de la matière blanche et de myéline sont supérieurs (45% plus élevé) chez les jeunes rats mâles âgés de 6-8 mois que chez les femelles âgées également de 6-8 mois, a mis en évidence que cette tendance s'inversait avec l'âge. En effet, les femelles âgées de 18 mois présentaient un volume de matière blanche et de myéline bien plus supérieur (18% plus élevé) que chez les mâles du même âge. Les effets de l'âge sur le volume de la matière blanche et la longueur des fibres myélinisées sont plus importants chez le rat mâle.

- L'âge

Le diamètre axonal moyen des fibres myélinisées dans la matière blanche de rats âgés est bien plus élevé que chez les jeunes rats. Cela serait dû à une perte des plus petits axones, ce qui augmenterait le diamètre axonal moyen avec l'âge. De plus, le volume des fibres myélinisées et de la myéline est plus élevé chez les femelles d'âge moyen que chez les jeunes femelles. Une cause physiologique

liée à l'âge peut expliquer cette observation : l'éclatement de la gaine de myéline ou split. Cela engendrerait une plus grande occupation des fibres myélinisées et augmenterait ainsi le volume de ces fibres et le volume de myéline de la matière blanche chez les rats femelles d'âge moyen.

Plusieurs études ont été publiées sur l'effet de l'âge dans les différents tissus nerveux. Des chercheurs ont mis en évidence une diminution de la densité de fibres avec l'âge [98] [99] [100]. Cependant l'influence de l'âge sur la gaine de myéline reste très peu étudiée.

- Les niveaux vertébraux

Le nombre de fibres dans la matière blanche varie le long des vertèbres, avec les fibres descendantes et ascendantes qui entrent progressivement [13]. Ohnishi et al (1976) ont reporté une diminution dans le nombre des fibres myélinisées dans le tract FG chez l'humain entre les vertèbres C3 à T5 [46]. La majorité des études couvrent les niveaux cervicaux plutôt que les niveaux thoraciques et lombaires.

La variation du diamètre axonal le long des vertèbres n'est pas claire. Leenen et al (1985) n'ont reporté aucunes variations dans le tract pyramidal chez le rat, contrairement à ce qui a été observé chez l'humain dans le tract FG [42] [46] [101].

- Les protocoles histologiques

De nombreux fixatifs et protocoles d'imageries ont été utilisés par la communauté neuroscientifique pour étudier la microstructure de la matière blanche, rendant difficile toute comparaison entre ces différentes études.

De plus, cette large variabilité de protocoles peut expliquer en partie la variabilité observée dans les résultats rapportés par les différentes études citées plus haut.

En effet, le choix du protocole peut avoir un impact sur le rétrécissement ou *shrinkage* des axones, les distorsions et les autres artefacts de fixation. Par exemple, les différentes solutions de fixatifs utilisés ont des osmolarités différentes et peuvent alors induire différents degrés de gonflement ou *swelling* de l'axone. Un autre cas qui se produit souvent : une fixation imparfaite de la gaine de myéline par l'osmium (due à une faible pénétration) induira une séparation des différentes couches de la myéline entre elles [43].

La variabilité intra-espèce semble très élevée, à la lumière de la littérature, mais reste très peu étudiée due à (i) la difficulté de mener ces expériences, et (ii) le nombre de paramètres confondants tels que l'âge, le sexe, et le niveau vertébral.

Même avec un protocole optimal, la résolution du microscope est problématique pour observer les axones.

## **2.3 Génération d'atlas de la matière blanche de la moelle épinière**

Les principaux défis dans la création d'un atlas microstructural de la matière blanche de la moelle épinière sont de pouvoir identifier précisément les différents tracts, bien préserver le tissu durant la préparation histologique pour pouvoir extraire les biomarqueurs.

La première question que l'on se pose est : Sur quoi se base notre atlas ? Un atlas peut être construit à partir de données histologiques ou de données IRM. Des métriques, tels que le diamètre axonal et le g-ratio peuvent être utilisées pour créer un atlas.

### **2.3.1 Méthodologie**

Il existe plusieurs méthodes pour construire un atlas de la matière blanche de la moelle épinière :

- IRM : on identifie et on extrait les informations anatomiques à partir d'un atlas d'histologie.
- Les coupes histologiques peuvent être utilisées pour identifier des tracts, en fonction des densités de fibres observées [43]. Avec cette méthode il est difficile de délimiter clairement chaque tract. Cependant certains tracts, tel que le dCST est bien défini, limité par les cornes dorsales et présentant une différence nette en densité et en diamètre axonal avec les tracts FC et FG [102] [13]. Néanmoins, cette méthode ne peut être appliquée aux tracts tels que le rubrospinal ou le corticospinal latéral [13].
- L'utilisation de traceurs (d-I, amines dextrane, Fluoro-gols, PHA-L) pour obtenir une identification précise des tracts de la matière blanche de la moelle épinière [103] [104] [105] [106] [107]. Le principal inconvénient de cette méthode est que de manière générale la pénétration des traceurs dans les tissus est faible [107]. De plus, il est difficile de préparer le tissu et d'identifier avec précision le tract [104] [105].

- Les modèles génétiques ont permis d'identifier spécifiquement les neurones du tract corticospinal à partir du cortex (Friel et al 2014).

## 2.3.2 Atlas existants

### 2.3.3 Les atlas de la matière blanche chez le rat

Aujourd'hui, dans la littérature, on peut trouver les atlas suivants (Figure 2-13, [108] [109] [110]) :

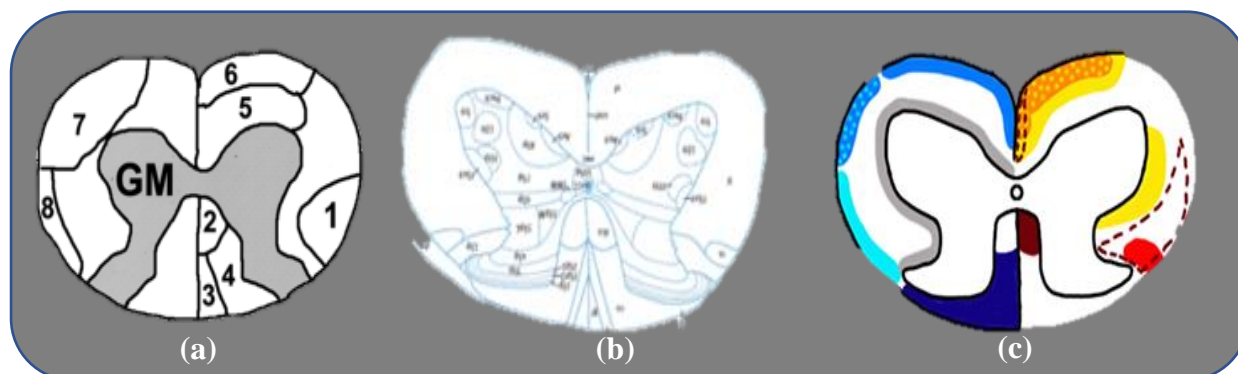


Figure 2-13 : Les atlas de la matière blanche de la moelle épinière dans la littérature : (a) atlas de niveau cervical avec les tracts suivant représentés : rubrospinal (1), dorsal corticospinal (2), fasciculus cuneatus (3), fasciculus gracilis (4), reticulospinal (5), vestibulospinal (6), (7), (8). (b) atlas de niveau cervical issu du livre de Paxinos, (c) atlas niveau cervical avec les tracts suivant représentés : en rouge, le rubrospinal, en jaune, le reticulospinal, en orange, le vestibulospinal, en bleu foncé, les fasciculus cuneatus et gracilis, en marron, le corticospinal, en bleu clair, le spinocerebellar, en bleu medium le spinothalamic et en gris le fasciculus proprius [108] [109] [110].

Toutefois, ces atlas présentent les limitations suivantes : (i) toute la matière blanche n'est pas labélisée. En effet, la plupart des études ont été dirigées vers le tract pyramidal. Et beaucoup d'études reposent sur des localisations approximatives et subjectives des tracts basés sur d'anciens travaux d'atlas (ii) ils sont basés sur peu de rats (<5), et (iii) ils ne reportent pas les informations sous-jacentes de la microstructure du tract.

Néanmoins, la taille et la localisation des tracts pourraient être sujettes à la variabilité inter-sujet, ce qui serait compliqué à prendre en compte avec l'atlas [111] [112].

De plus, certains tracts pourraient être superposés les uns sur les autres, tels que les tracts vestibulospinal latéral, spinothalamique latéral et réticulospinal rostral chez la souris. Cette observation pourrait être extrapolée chez le rat.

Quelques initiatives ont été menées par la communauté IRM. Un atlas de la moelle épinière chez l'homme a été créé pour les niveaux cervicaux C1 à C8 [113].

## **2.4 Originalité du projet de maîtrise**

### **2.4.1 Peu d'informations sur la microstructure des tracts**

A la lumière de la littérature, une cartographie complète de la microstructure de la matière blanche de la moelle épinière est difficile à obtenir. La littérature contient très peu d'études microstructurales de la matière blanche. Les données sur la morphométrie axonale sont par conséquent rares, et l'intérêt prédominant à l'égard des tracts corticospinal et pyramidal se fait aux dépens des autres tracts. Ces données concernent essentiellement les niveaux cervicaux et un tract en particulier : le tract pyramidal et plus précisément le tract corticospinal. Cela s'explique par le fait que le tract corticospinal est impliqué dans le contrôle moteur des membres et est endommagé dans nombreuses maladies neuro-dégénératives telles que la sclérose en plaques multiples et par le fait qu'il est grand donc facilement identifiable [114]. En ce qui concerne les autres tracts; il y a très peu d'informations si ce n'est que le fasciculus gracilis dans la colonne dorsale contient principalement de petits axones, alors que les autres tracts tels que le corticospinal dans les colonnes latérales et ventrales contiennent un mélange de petits et gros axones [79]. Il y aussi très peu de données sur l'épaisseur de la gaine de myéline dans la littérature.

Puis, mis à part, les études microstructurales publiées à ce jour, un autre problème est à souligner : le manque d'homogénéité dans les résultats inter-études ou même intra-études. Il est difficile de tirer des valeurs standards absolues de ces études car les résultats varient beaucoup et de connaître l'origine de ces variabilités. Nous avons mentionné, plus haut, que la diversité des protocoles histologiques, le manque de précision dans la terminologie des concepts de base et une variabilité inter-sujet élevée.

## 2.4.2 Difficulté à déterminer les tracts de la matière blanche

En effets, très peu d'études histologiques des tracts de la matière blanche ont été menées. Une des principales raisons est la difficulté d'identifier les tracts. La méthode classique est d'injecter des traceurs dans le tract ciblé pour colorer les fibres appartenant au tract. Cependant la distance de pénétration est courte et le temps de propagation est long [107]. De plus, les fibres, dans la pratique ne sont pas regroupées en zones bien délimitées; elles peuvent se mélanger, se décusser; c'est-à-dire se croiser en forme de X, ou se superposer, tels que les tracts vestibulospinal latéral, spinothalamique ventral réticulospinal rostral. Ensuite, la forme et la position de ces tracts peuvent varier d'un individu à un autre [111] [109].

Il y a un besoin de poursuivre les investigations sur la morphométrie de la moelle épinière avec un pouvoir statistique élevé. Pour atteindre cette objectif, l'analyse complète de chaque section vertébrale de la moelle de plusieurs animaux est nécessaire pour fournir une vue d'ensemble pertinente de la variabilité inter-sujet. Due à la grande surface de la moelle (4 mm<sup>2</sup> chez le rat et 1 cm<sup>2</sup> chez l'humain) et la faible taille des axones (1 um), des techniques d'imagerie rapides à haute résolution sont nécessaires. Pour analyser ces images, nous avons besoin d'un logiciel de segmentation automatique et précis.

Dans le Chapitre 3, qui suit, les méthodes pour préparer et observer le tissu, puis pour construire l'atlas microstructural de la matière blanche chez le rat sont présentées. Le Chapitre 4 met en évidence les résultats obtenus tels que les données brutes de microcopie électronique, ainsi que les cartes moyennées entre les rats et le long des niveaux vertébraux pour les différentes statistiques. De plus l'étude de la variabilité de ces métriques est aussi présente. Enfin le présent mémoire s'achève avec une discussion des résultats et les limites du projet.



## CHAPITRE 3 MATÉRIAUX ET MÉTHODES

### 3.1 Modèles de rat

Les rats (femelles et mâles), en bonne santé sont fournis par l'institut de cardiologie de Montréal. Ils sont logés par deux au maximum dans les cages à une température de 22°C. Ils ont suivi un cycle constant de 12h de lumière et de 12h de nuit. La nourriture et l'eau sont fournies ad libitum (à satiété). Pour la technique d'immersion les rats ont été anesthésiés avec du CO<sub>2</sub> et sacrifiés par dislocation. Pour la technique de perfusion les rats ont été anesthésiés avec de l'isoflurane 3% et 2 mL d'oxygène.

### 3.2 Protocoles d'histologie

#### 3.2.1 Aperçu général

Pour préparer nos tissus, nous avons à la fois utilisé l'immersion et la perfusion, puis nous avons osmifié (coloré avec du tétr oxyde d'osmium), déshydraté, enrobé dans de la résine et poli le tissu avant observation au MEB (Figure 3-1).

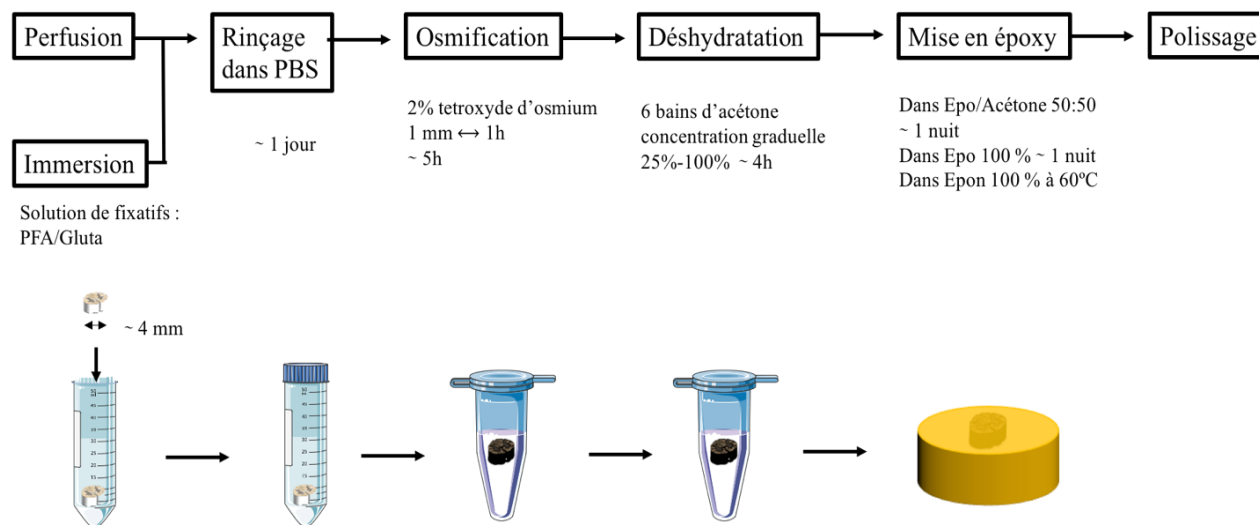


Figure 3-1 : Les étapes de la préparation du tissu.

Les différents protocoles utilisés pour ce projet sont décrits dans le tableau 3-1.

Tableau 3-1 : Les différents protocoles de fixation utilisés.

Rat	Sexe	Âge (mois)	Immersion	Perfusion (débit en mL/min)	PFA (%)	Ga (%)	Tétraoxyde d'osmium (%)	Temps d'osmification (h)
Maxo	Mâle	2.5		12	3	3	2	5
Lexie	Femelle	~ 5 mois		5	3	3	2	5
Yogesh	Mâle	~3 mois		~ 10	3	3	2	5
Lili	Femelle	~ 5 mois			4		2	4
Xena	Femelle	~ 5 mois		15	2	2.5	2	5
Mina	Femelle	~ 5 mois			4		2	5
Dori	Femelle	~ 5 mois			4	2.5	2	6
Dori	Femelle	~ 5 mois			2	2	2	6
Dana	Femelle	~ 5 mois		15	4		2	5

Il faut noter que pour la création de notre atlas nous n'avons pas le même nombre de coupes histologiques différentes entre les niveaux vertébraux. Pour l'instant notre atlas ne prend en compte que la moelle complète de deux rats. Nos efforts se poursuivent pour construire notre atlas final avec 5 moelles de rats au complet (5 coupes histologiques pour chaque niveau vertébral) pour la publication de notre article prévue cet automne.

### 3.2.2 Préparation des tissus

Pour préparer nos échantillons nous avons utilisé deux fixatifs primaires : Ga et PFA et un fixatif secondaire (tétroxyde d'osmium). Après immersion ou perfusion et extraction de la moelle épinière, la moelle est coupée en petits morceaux d'environ 3 mm d'épaisseur et rincés dans une solution tampon phosphate saline (PBS) à 0.1M pendant au moins une nuit. Une fois rincés, les tissus sont osmifiés pendant ~5h. Après l'osmification les tissus sont déshydratés dans plusieurs bains d'acétone de concentration graduelle : 25%, 35%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% et 100%, 30 min dans chaque bain. Une fois déshydratés les tissus sont mis dans une solution 50% acétone/50% époxy toute une nuit. Puis ils sont mis dans une solution de 100% époxy pendant au moins 6h. Ensuite ils sont mis dans une nouvelle solution de 100% époxy, au four à 60°C le temps que la résine polymérise et se durcisse.

Les solutions de résine époxy sont produites avec la recette suivante [115] :

Tableau 3-2 : Protocoles de préparation des solutions de résine époxy.

	Petit volume (mL)	Moyen volume (mL)	Grand volume (mL)
<b>Mixture A</b>			
EMbed 812	5	20	62
DDSA	8	31	100
<b>Mixture B</b>			
EMbed 812	8	20	100
NMA	7	17	90
<b>Mixture d'enrobage finale</b>			
Mixture A	13	51	162
Mixture B	15	37	190
DMP-30	0.42-0.56	1.3-1.7	5.3-7.0

Tous les produits chimiques utilisés pour la préparation des tissus sont achetés chez Mecalab (Montréal).

L'EMbed812 est la résine la plus utilisée pour la microscopie électronique. Le NMA étant une solution très visqueuse, il est recommandé de le chauffer à 60°C pour faciliter sa miscibilité avec le EMbed812. Une fois la mixture finale de résine préparée, celle-ci peut être stockée jusqu'à 6 mois à 4°C. Cependant il est vivement recommandé de l'utiliser fraîchement préparée.

Une fois les tissus mis dans les moules de résine, ils sont prêts à être polis.

### **3.2.3 Polissage des échantillons**

L'objectif du polissage est d'obtenir une surface plane. Le polissage est assuré grâce à des tapis abrasifs de taille millimétrique et micrométrique. Les paramètres de contrôle pour garantir un polissage réussi sont le choix des tapis (de différents diamètres de grains), la lubrification (les différentes solutions de nanoparticules), la force d'appui sur l'échantillon, la vitesse de rotation du tapis, et la durée du polissage.

Notre polissage consiste en trois étapes : (i) l'étape de polissage grossier s'effectue avec un tapis abrasif de grains de 40 µm avec un arrosage d'eau en continu. Cet arrosage a un double but : refroidir le tapis et l'échantillon, et évacuer les résidus produits par l'abrasion entre la résine dure et le tapis, (ii) polissage au tapis de grains d'1 µm avec une suspension diamantée monocristalline d'1 micron comme lubrifiant, (iii) polissage au tapis de grains de 0.05 µm avec comme lubrifiant l'oxyde d'aluminium colloïdale en suspension de 0.05 micron.

Le polissage a été réalisé au laboratoire CM2 de Polytechnique Montréal.

Une fois l'échantillon poli, on réalise un dépôt d'or par plasma (Sputter Coater SC502 Polaron) et on utilise un pistolet à CO<sub>2</sub> pour enlever la poussière; cela décontamine la surface de l'échantillon par action mécanique due au transfert d'impulsions des molécules de gaz accélérées aux contaminants.

## **3.3 Protocole d'acquisition au microscope électronique à balayage (MEB)**

### **3.3.1 Caractéristiques générales**

Dans le cadre de ce projet, la microscopie utilisée pour acquérir entièrement la matière blanche est la microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour *Scanning Electron Microscopy* en anglais). Ce type de microscope permet d'avoir, au mieux, une résolution de 1 nm, comparé au

microscope optique qui est limité à une résolution de 200 à 350 nm et qui ne détectent pas les plus petits axones (<200 nm).

Les acquisitions au MEB ont été menées au CM2 à Polytechnique avec le microscope JEOL JSM7600F qui est un microscope électronique à balayage équipé d'un canon électronique à effet de champ (FEG) pouvant atteindre de très hauts courants (>200 nA). Ses caractéristiques sont les suivantes :

Tableau 3-3 : Caractéristiques du microscope JEOL JSM7600F

Source d'électrons	Résolution		Tension d'accélération	Courant	Grossissement	Nombre et taille de diaphragme	Profondeur de champ	Distance de travail
Canon à effet de champ de type Shotky	1 nm à 15 kV	1.4 nm à 1 kV	0.1 kV à 30 kV	$10^{-12}$ à $5 \times 10^{-7}$ A	X25 à X1 000 000	1 : 30 $\mu$ m 2 : 50 $\mu$ m 3 : 70 $\mu$ m 4 : 110 $\mu$ m	4 mm-0.4 $\mu$ m	1.5 à 40 mm

### 3.3.2 Paramètres d'acquisition

#### 3.3.2.1 Détecteurs

Deux types de signaux d'électrons peuvent être détectés : les électrons secondaires et les électrons rétrodiffusés. Les images acquises via ces deux modes présentent différentes informations pour un même échantillon.

- Détecteur SEI

Lors de la collision entre les électrons primaires et les atomes de l'échantillon, des électrons dits secondaires sont générés par ionisation. Ces électrons possèdent à la sortie une faible énergie cinétique, et une information topographique de l'échantillon.

Ce mode permet d'obtenir des informations sur la morphologie de la surface de l'échantillon.

- Détecteur LEI

Il s'agit d'un détecteur d'électrons secondaires. Il permet d'obtenir des informations sur la topographie de l'échantillon.

- Détecteur LABE

Le JEOL JSM7600F est équipé d'un détecteur conventionnel d'électrons rétrodiffusés ainsi que d'un détecteur d'électrons rétrodiffusés à faible angle (LABE pour *Low Angle Backscattered Electrons*).

Les électrons rétrodiffusés (*back-scattered electrons*) sont les électrons qui interagissent avec les noyaux d'atomes de l'échantillon puis sont réémis dans une direction proche de leur direction d'origine avec une faible perte d'énergie. Cette interaction se produit à de plus grandes profondeurs dans l'échantillon que celle des électrons secondaires. Ces électrons possèdent à la sortie de l'échantillon; une énergie cinétique élevée et une bonne sensibilité à la composition chimique locale.

L'avantage du détecteur d'électrons rétrodiffusés à faible angle est de collecter les électrons rétrodiffusés qui quittent l'échantillon à de plus faibles angles, c'est-à-dire, les électrons ayant un rayon plus grand dans le champ magnétique de la lentille de focalisation. Ainsi, le détecteur LABE est plus sensible aux informations de surface et dans nos conditions d'acquisition, le détecteur LABE fonctionne mieux que le détecteur des électrons secondaires car les électrons rétrodiffusés de haute énergie sont moins affectés par les effets de charge induits par le faisceau d'électrons.

### **3.3.2.2 Tension d'accélération**

Nous avons utilisé une tension comprise entre 15 et 20 kV. Cependant, à de telles tensions, il faut faire attention aux effets de charges. Plus la tension d'accélération est élevée plus la taille du volume d'échantillon ionisé sous la surface est élevée, i.e. plus la vitesse des électrons est élevée. Plus elle est élevée, plus le diamètre de la sonde est petit pour un même courant. En théorie, la résolution d'une image est meilleure à forte tension d'accélération.

### **3.3.2.3 Sonde de courant**

La sonde de courant émet des électrons contenant les informations sur l'échantillon tels que les électrons primaires et rétrodiffusés. Le courant est déterminé par la taille de la sonde qui est directement liée à la taille du diaphragme. Si l'ouverture est grande, la luminosité des images est grande mais la résolution est faible. Si la taille de la sonde du courant est petite, alors la résolution des images est élevée mais leur luminosité est faible. Nous avons utilisé un courant compris entre 13 et 16 nA.

### 3.3.2.4 Distance de travail

La distance de travail est la distance entre la surface de l'échantillon et la lentille objectif (dernière lentille de l'instrument). Elle influe sur le diamètre du faisceau.

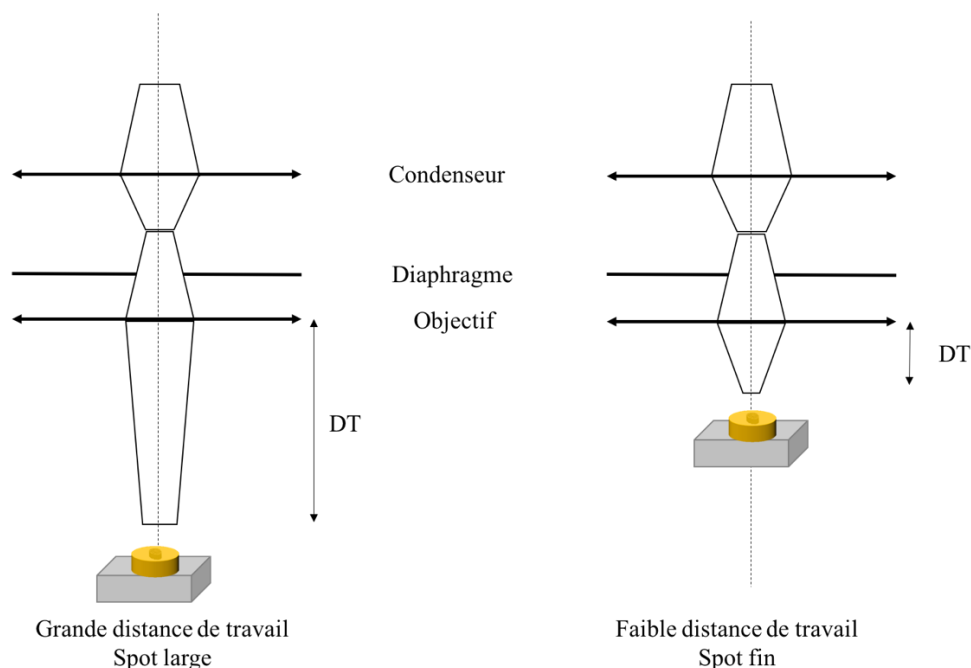


Figure 3-2 : Distance de travail au microscope électronique à balayage.

La distance de travail influence le diamètre du faisceau; plus la distance de travail est petite, plus le faisceau est fin.

Nous avons utilisé une distance de travail de 25 à 30 mm. Le signal en électrons diminue lorsque la distance de travail diminue. L'utilisation d'une grande distance de travail permet d'augmenter la profondeur de champ.

### 3.3.2.5 Ouverture du diaphragme

Les électrons provenant du canon à électrons sont émis avec des énergies cinétiques et des directions différentes. Ils peuvent ne pas être focusés pour former un point précis.

Le diaphragme joue un rôle fondamental sur l'intensité du faisceau et la profondeur de champ. En effet, il permet de contrôler le courant en laissant passer une plus grande ou plus petite fraction d'électrons.

Pour nos observations nous avons utilisé le diaphragme 2 (taille d'ouverture de 50  $\mu\text{m}$ ), qui permet de réduire l'angle d'ouverture du faisceau pour minimiser au mieux les aberrations de l'optique électronique, concentrer l'intensité du faisceau sur l'échantillon et améliorer la profondeur de champ.

### 3.3.2.6 Profondeur de champ

Le MEB a une grande profondeur de champ, ce qui permet d'avoir une grande partie de l'échantillon dans le focus :

$$D = \frac{4 \times 10^5 \times W}{A \times M} (\mu\text{m}) \quad (2)$$

Pour augmenter la profondeur de champ  $D$ , on peut diminuer l'ouverture du diaphragme ( $A$ ), le grossissement ( $M$ ) ou augmenter la distance de travail  $W$  (mm). Les paramètres d'acquisition utilisés sont les suivants :

Tableau 3-4 : Paramètres d'acquisition du MEB utilisés pour ce projet de recherche.

Tension d'accélération	Courant (nA)	Distance de travail (mm)	Grossissement	Détecteur	Diaphragme
15-20 kV	14-16	25-30	X200	LABE	2 (50 $\mu\text{m}$ )

## 3.4 Traitement des données

### 3.4.1 Aperçu général

Nous trouverons sur la Figure 3-3 un aperçu général de la méthode mise au point pour construire notre atlas microstructural de la matière blanche de la moelle épinière chez le rat.

Les étapes sont les suivantes :

1. Sacrifice de l'animal par perfusion ou pour l'immersion (vu au 3.1).
2. Extraction de la moelle épinière.
3. Préparation des blocs de tissu (vu au 3.2).
4. Acquisition au MEB (vu au 3.3).



5. Assemblage des sous-images acquises au MEB pour former la mosaïque ou Panorama de la moelle au complet.
6. Segmentation du Panorama.
7. Sous-échantillonnage du Panorama.
8. Moyennage entre les différents Panoramas sous-échantillonnés pour les différents rats et pour les différents niveaux vertébraux.
9. Recalage des Panoramas moyennés sur l'atlas de référence.
10. Extraction des différentes métriques pour les 12 tracts.
11. Génération d'une cartographie 3D de la microstructure de la matière blanche pour tous les niveaux vertébraux basée sur le moyennage des informations microstructurales entre plusieurs rats. Cette étape sera réalisée prochainement.

L'aperçu général de la méthode de la création de l'atlas est présenté à la Figure 3-3.

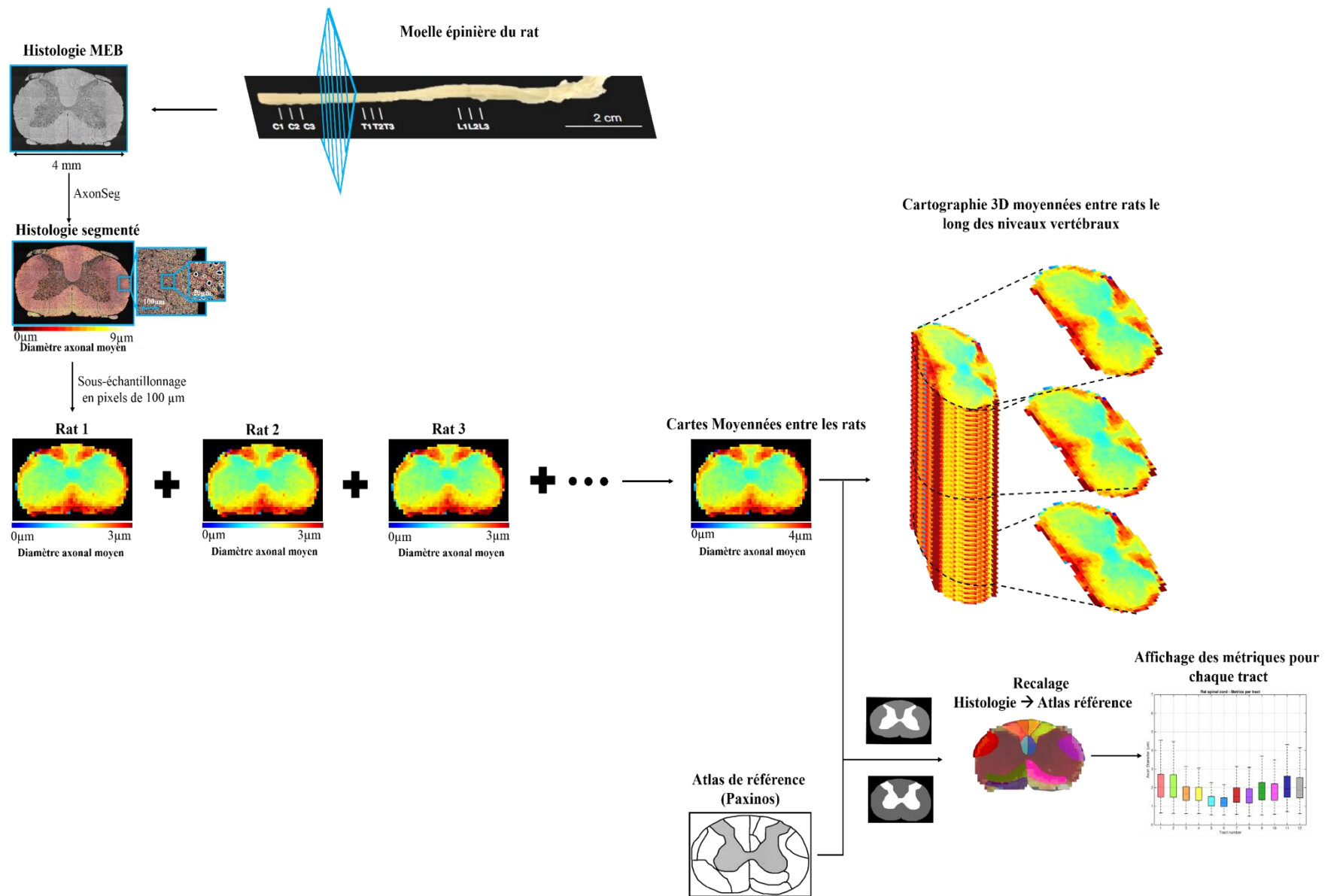


Figure 3-3 : Aperçu général de la méthode pour la construction de l'atlas de la matière blanche chez le rat

### 3.4.2 Assemblage panoramique de la mosaïque

Les images histologiques sont acquises au microscope électronique à balayage (MEB) selon les paramètres mentionnés au 3.3.2. A cause des limitations de l'instrument, nous ne pouvons pas acquérir en une seule image la section de la moelle au complet, qui mesure entre 3 et 4 mm de diamètre. Pour y remédier, on utilise le logiciel Aztek permet de balayer une région que l'on délimite par un rectangle, au sein duquel se trouve la section complète de la moelle, et de scanner la moelle sous-image par sous-image (mosaïque) avec un chevauchement de 15-20%. Puis, les sous-images sont assemblées avec le logiciel Fiji pour former la mosaïque complète de la section de moelle. La méthode est présentée à la Figure 3-4.

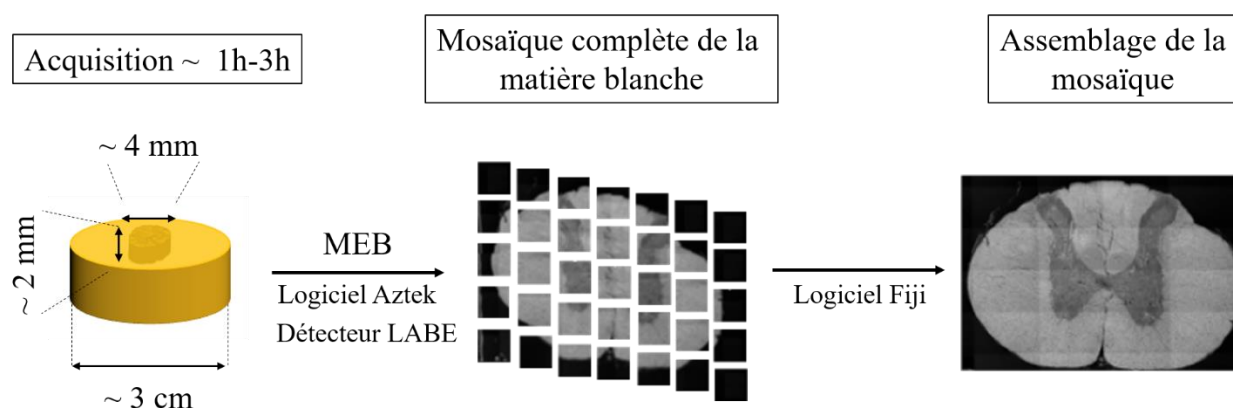


Figure 3-4 : Assemblage des sous-images après l'acquisition au MEB pour générer la mosaïque complète de la matière blanche.

### 3.4.3 Identification des niveaux vertébraux

Pour identifier nos échantillons, i.e pour savoir à quel niveau vertébral ils appartiennent, nous avons utilisé l'atlas histologique de Paxinos constitué seulement de coupes histologiques de la matière blanche, préparées avec la coloration Nissl, avec tous les niveaux vertébraux labélisés (Figure 3-5). La méthode consiste à comparer chacune de nos coupes histologiques, dont nous ne connaissons par le niveau vertébral auquel il appartient, avec chacune des coupes histologiques dans le livre de Paxinos, pour lesquelles le niveau est déjà déterminé.

Pour cela on réalise un masque binaire, i.e. qu'on réalise un masque à la fois pour la matière blanche et pour la matière grise pour chacune des coupes de l'atlas de Paxinos et pour nos propres images histologiques. La comparaison et l'identification se base sur la forme de la matière grise des coupes de Paxinos et de nos coupes. En d'autres termes, on compare la forme de la matière grise chaque image histologique que nous avons obtenue à chaque coupe de Paxinos.

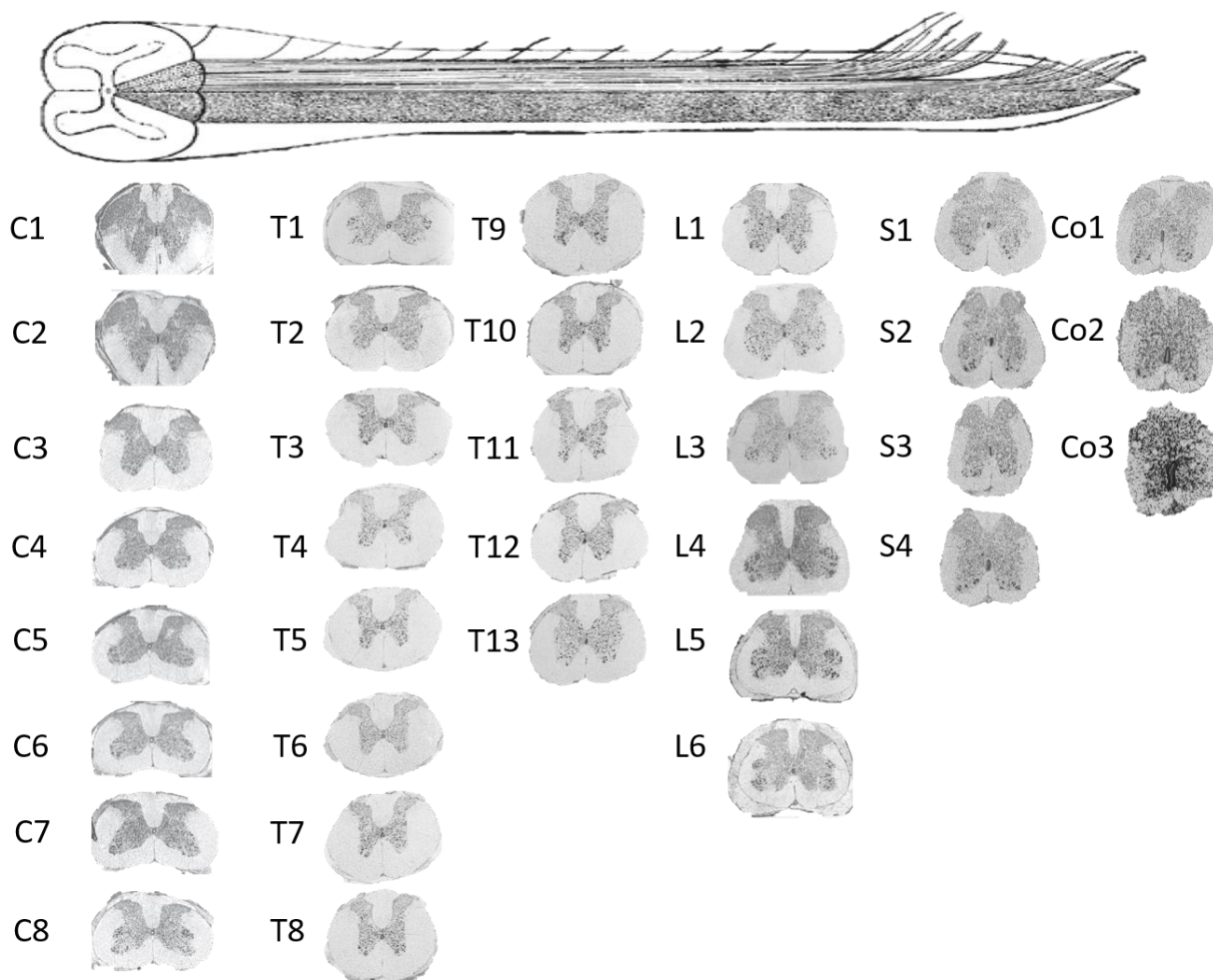


Figure 3-5 : Atlas de coupes histologiques de la matière blanche.

L'identification des niveaux repose sur la méthode d'apprentissage non supervisée en utilisant l'erreur quadratique moyenne (MSE ou Mean Squared Error), définie par :

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_0^n (\bar{y}_i - y_i)^2 \quad (3)$$

Avec  $n$  le nombre total de pixels dans la matière grise des images histologiques (les nôtres et celles de Paxinos),  $\bar{y}_i$  la valeur du pixel des coupes histologiques de Paxinos et  $y_i$  la valeur du pixel de la matière grise de notre image histologique. Pour chacune de nos images histologiques, on calcule le MSE entre notre image histologique et chacune des coupes de Paxinos et on choisit le MSE minimum. Ainsi plus le MSE est petit, plus l'image histologique est similaire à la coupe de Paxinos dont le niveau vertébral est déjà connu.

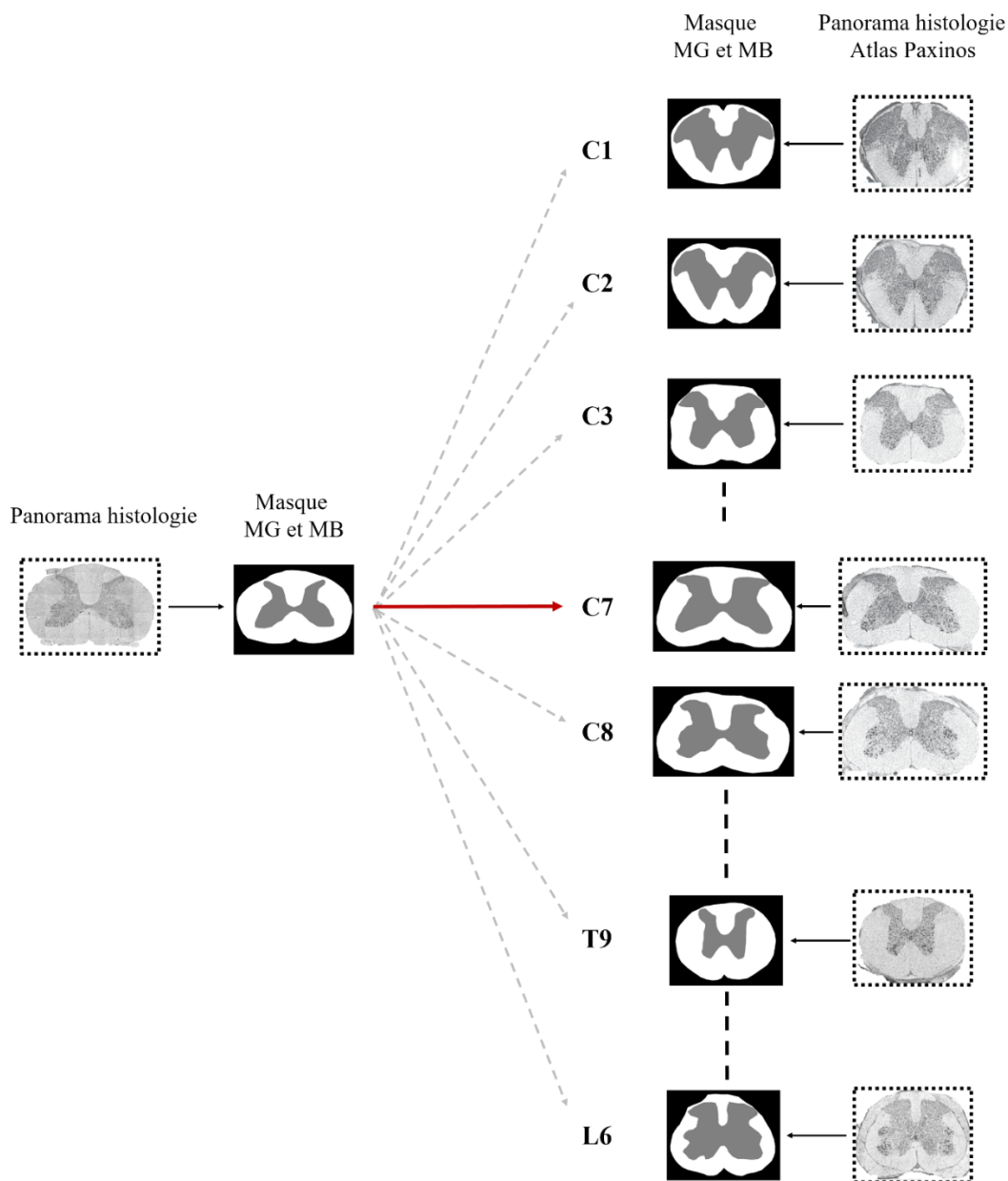


Figure 3-6 : Identification des niveaux vertébraux des échantillons acquis au MEB.

### 3.4.4 Segmentation

Pour segmenter nos images SEM, nous avons utilisé le logiciel AxonSeg, développé par deux étudiants en maîtrise et en doctorat du labo, Aldo Zaimi et Tanguy Duval [116]. Ce logiciel permet de segmenter de manière automatique les axones et la myéline. La segmentation se base sur l'hypothèse suivante : Les vrais axones sont ronds, convexes, avec une faible intensité et sont entourés par une gaine de myéline, qui elle, a une forte intensité.

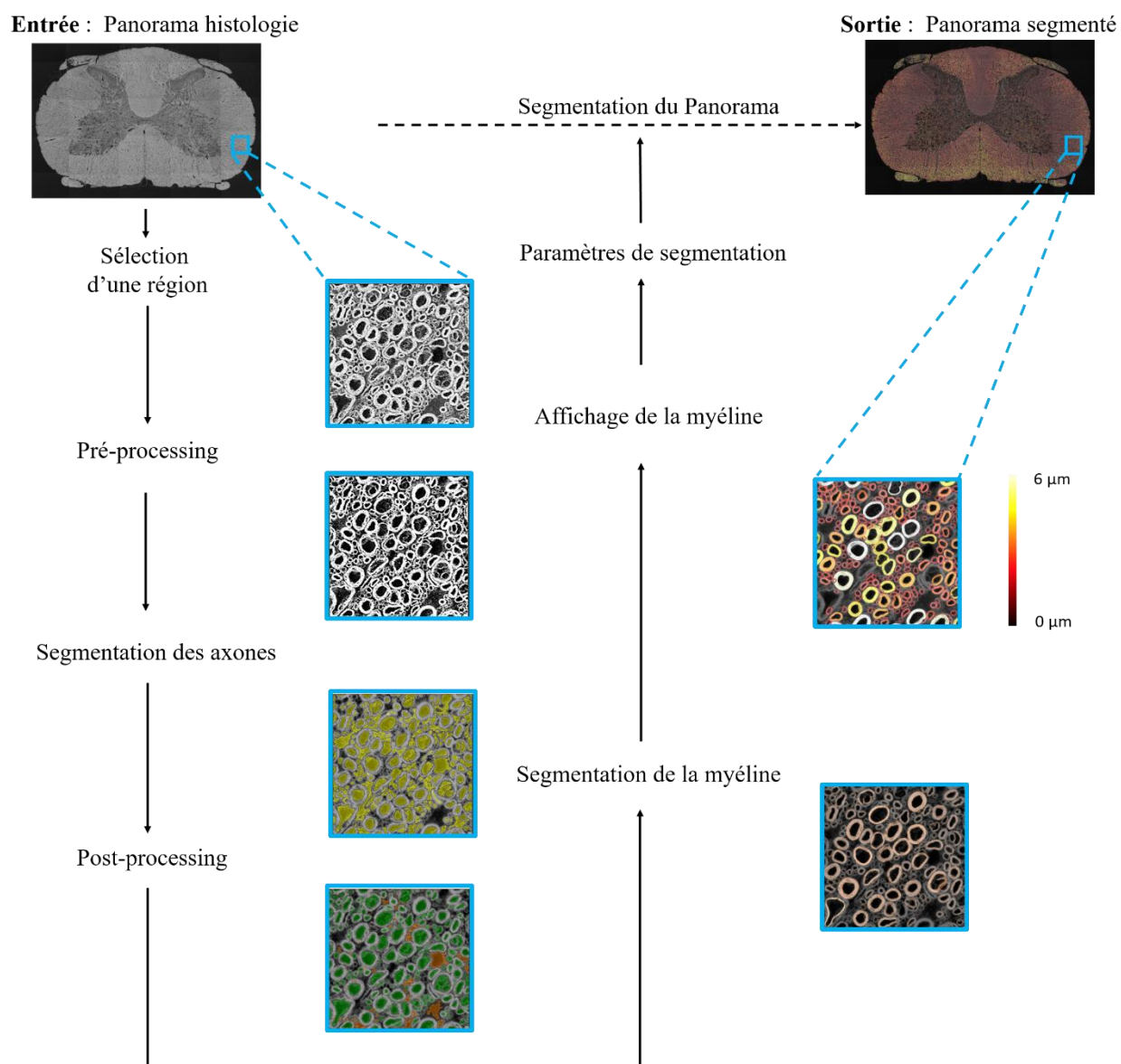


Figure 3-7 : Illustration des principales étapes de la segmentation par AxonSeg.

### 3.4.4.1 Paramètres de segmentation

Avant de segmenter la moelle au complet, une pré-segmentation est réalisée de manière à obtenir les paramètres de segmentation. Les paramètres de segmentation sont déterminés sur une sous-image (Electron Image) du Panorama pour sélectionner les meilleurs paramètres en se basant sur la forme de l'axone et l'intensité de l'image.

Les paramètres de segmentation comprennent les informations suivantes : taille du pixel, l'inversion de l'intensité (pour s'assurer que les axones sont plus noirs que la myéline), le contraste, la taille minimum des axones à prendre en compte (détermination du nombre de pixels par axone en choisissant un seuil), solidité, ellipticité, les seuils pour la segmentation des axones avec les *extended minima*.

La circularité décrit la rondeur de l'objet (ici l'axone) i.e. le degré de similarité avec un cercle parfait. Une valeur de 1 désigne un cercle parfait et plus la valeur de circularité s'approche de 0, moins la forme de l'objet est circulaire. La circularité est définie par :

$$Circularité = \frac{4\pi \cdot Aire(Axone)}{Périmètre(Axone)^2} \quad (4)$$

La solidité décrit la compacité de l'objet i.e. à quel point l'objet est convexe ou concave. La solidité d'un objet complètement convexe est 1 et plus la solidité dévie de 1, plus l'objet est concave. La solidité est définie par :

$$Solidité = \frac{Aire(Axone)}{Aire\ convexe(Axone)} \quad (5)$$

Où l'aire convexe est l'aire du polygone contenant l'objet.

Les étapes de la segmentation par AxonSeg sont les suivantes : (i) on sélectionne une petite région du Panorama (i.e. moins de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ) obtenu après l'acquisition au MEB. On applique l'algorithme de segmentation des axones (*extended minima*), (ii) on retire les faux positifs (faux axones détectés) en jouant avec les paramètres de solidité et circularité, (iii) on enlève

manuellement les derniers faux axones qui restent, (iv) segmentation de la myéline, (v) création d'un axonlist, structure qui contient toutes les informations sur les axones (diamètre, densité ...). L'axonlist est ensuite nettoyé pour diminuer le biais dû à la segmentation en supprimant de la liste tous les axones ayant un diamètre au-dessus de 15  $\mu\text{m}$  et en ne gardant que les axones ayant une circularité au moins de 0.5.

Nous avons déterminé les paramètres de segmentation (i.e. taille du pixel, *extended minima*, solidité, circularité ...) pour un échantillon puis nous avons appliqué ces mêmes paramètres pour tous les échantillons.

### 3.4.4.2 Validation

Pour valider la segmentation automatique menée par AxonSeg, on réalise des *ground truths* des segmentations d'axones dans une région des différents tracts. A l'aide du logiciel Mipav, on segmente manuellement les axones de la région sélectionnée (images test). Le masque binaire (la valeur logique vraie est attribuée aux axones et la valeur logique fausse est attribuée au fond de l'image) qui en résulte, est utilisé pour déterminer la qualité de la segmentation par AxonSeg; sa sensibilité et sa précision, pour évaluer la capacité d'AxonSeg à distinguer les vrais des faux axones.

Les vrais positifs (VP), les faux négatifs (FN) et les faux positifs (FP) sont obtenus en comparant les masques binaires produits par AxonSeg et la segmentation manuelle pour une région donnée en utilisant les positions de centroïdes des axones. Ici, un VP est défini comme un axone correctement identifié (présent à la fois dans l'image contrôle et l'image test), alors qu'un FN est défini comme un vrai axone rejeté par le logiciel (présent dans l'image contrôle mais absent de l'image test). On peut aussi identifier les FP, décrits comme les axones présents dans l'image test mais absent de l'image contrôle.

La sensibilité, aussi appelée VP, est définie par :

$$VP = \frac{VP}{VP + FN} \quad (6)$$

La précision, aussi appelée valeur prédictive positives (VPP), est définie par :

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} \quad (7)$$



La qualité des segmentations d'axones, manuelles (images tests) et automatiques (images contrôles) est mesurée à l'aide du coefficient *Dice*. En prenant deux images binaires I et J de la même taille, on définit a le nombre de pixels pour lequel les valeurs correspondantes aux images I et J sont égales à 1 (valeur vraie). On définit aussi b et c comme le nombre de pixels pour lequel une valeur 0 (valeur fausse) dans I correspond à une valeur 1 dans J et une valeur 1 dans I correspond à une valeur 0 dans J. On définit alors le coefficient Dice entre les images I et J par :

$$D = \frac{2a}{2a + b + c} \quad (8)$$

Pour chaque axone d'une image test I et de son axone correspondant dans l'image contrôle (AxonSeg), i.e pour tous les VP détectés, le coefficient Dice est calculé.

### 3.4.5 Sous-échantillonnage

Une fois notre image histologique segmentée, elle est sous-échantillonnée par fenêtre de 100x100  $\mu\text{m}^2$  (Figure 3-8). Le sous-échantillonnage entraîne une modification de la résolution de l'image en diminuant le nombre de pixels qu'elle contient. Le but de sous-échantillonner les Panoramas segmentés est de mesurer la microstructure par fenêtre de 100x100  $\mu\text{m}^2$  afin de garder une information locale (i.e une homogénéité des tracts).

La méthode est la suivante : les axones sont triés en fonction de la position de leur centroïde et on obtient en sortie un tableau (appelé axonlist) représentant un mosaïquage. Chaque pixel de 100x100  $\mu\text{m}^2$  contient une valeur moyenne de la métrique considérée et chaque cellule de tableau stocke l'ID des axones.

Ainsi, grâce à ce tableau, on peut extraire les données quantitatives pour chaque pixel de 100x100  $\mu\text{m}^2$ , le diamètre axonal, la densité axonale, l'épaisseur de la myéline et le g-ratio (leur moyenne et l'écart type). Les équations utilisées pour calculer ses données quantitatives sont présentées au 3.4.8.2.

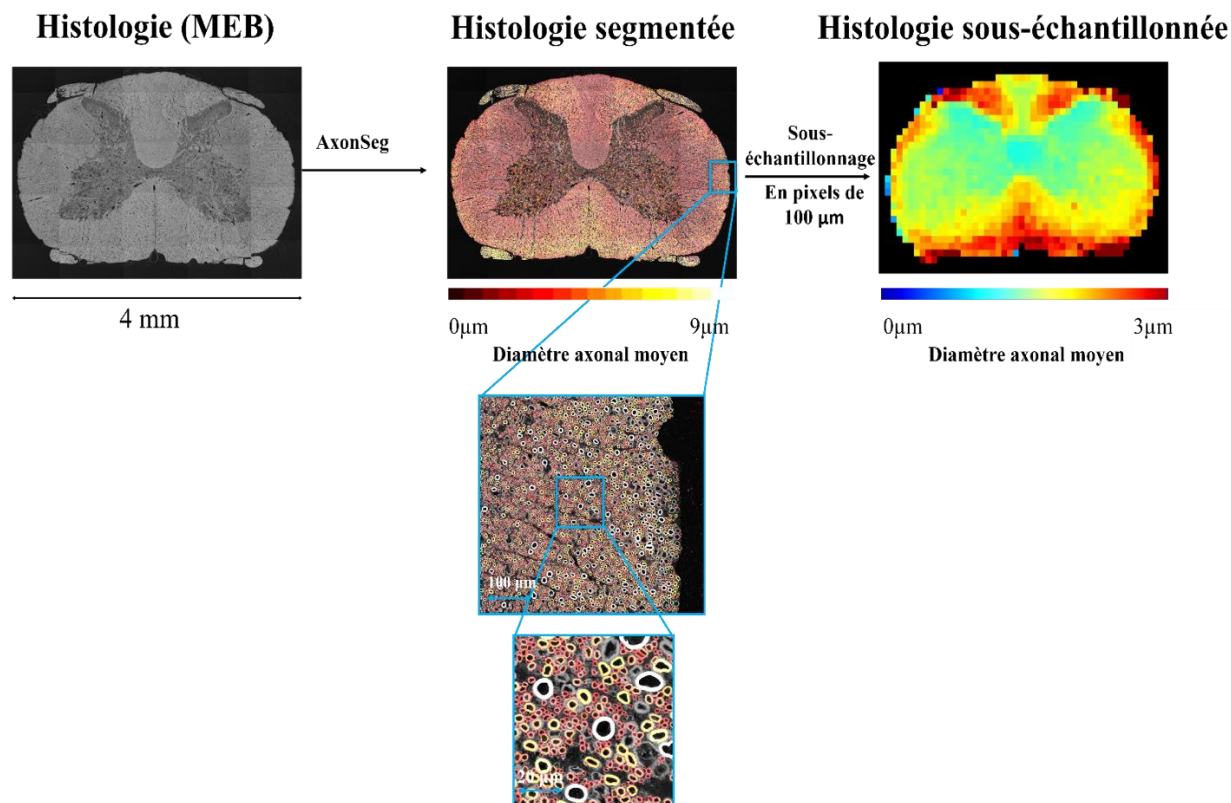


Figure 3-8 : Sous-échantillonnage de la matière blanche segmentée.

### 3.4.6 Comparaison des protocoles histologiques

Nous avons vu dans la revue de littérature, qu'il y a presque autant de protocoles histologiques que d'articles traitant de ce sujet. Comme nous ne connaissons pas l'impact de l'utilisation de différents protocoles pour créer notre atlas, nous avons choisi de les prendre tous en compte (sauf les images histologiques très mal conservées). Nous supposons que l'utilisation de différents protocoles histologiques induit une variabilité.

Pour mesurer le diamètre axonal, la circularité de la fibre est un paramètre important à prendre en compte. Le facteur de forme d'une fibre ou excentricité est le ratio, pour une fibre, du plus petit diamètre sur le plus gros [42]. Dans le tract pyramidal, ce facteur a été mesuré par Leenen et al. (1985) [42] à hauteur de 0.75 pour les axones myélinisés en comptant la gaine de myéline et de 0.70 pour les axones myélinisés en ne tenant pas compte de la gaine de myéline.

Ces facteurs de forme peuvent varier d'un protocole de fixation à un autre, en fonction des artefacts de fixation (*shrinkage/swelling*).

En faisant l'hypothèse que les axones sont parfaitement circulaires, on peut observer des formes elliptiques si le tissu n'est pas coupé correctement. Ainsi, la mesure de la circularité peut s'avérer utile pour quantifier l'impact des protocoles de fixation sur l'intégrité du tissu et l'étendue de potentielles distorsions axonales. La valeur de la circularité dans les différents protocoles de fixation (immersion et perfusion), avec différentes concentrations de fixatifs (Ga et PFA), pourrait aider le lecteur à contrôler le degré du biais induit par les études histologiques dans les valeurs morphométriques rapportées.

Pour comparer les différents protocoles entre eux, voici les paramètres utilisés : (i) circularité, (ii) solidité, (iii) ellipticité, et (iv) g-ratio. La méthode est présentée à la Figure 3-9.

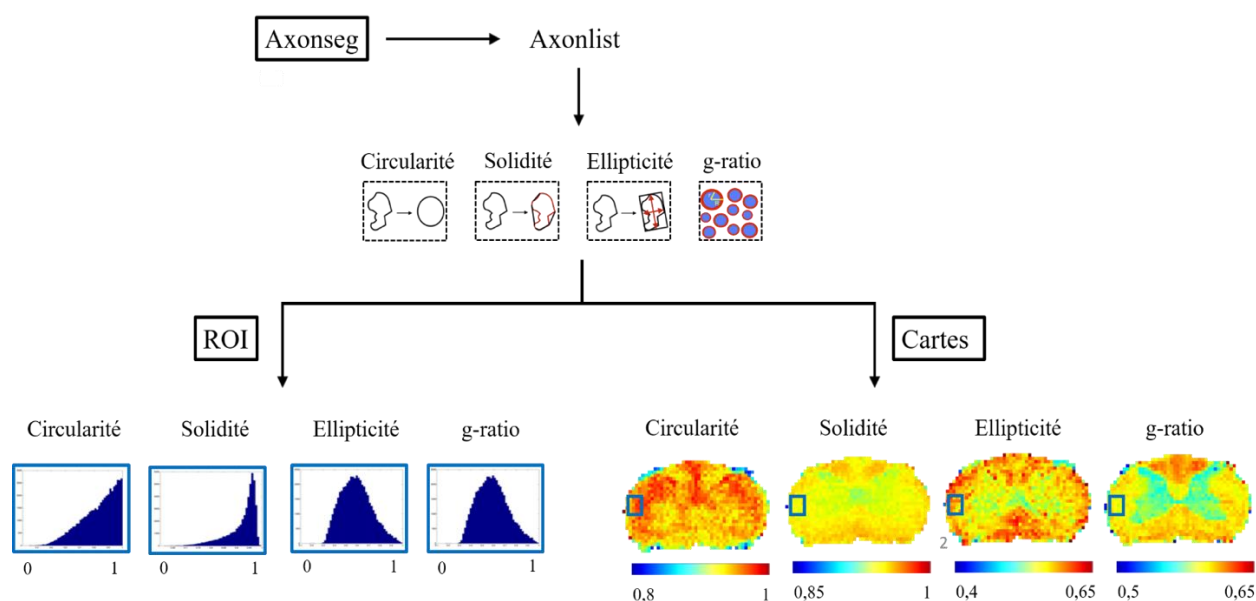


Figure 3-9 : Méthode de quantification de la préservation de la matière blanche.

L'axonlist de chaque image histologique segmentée contient les valeurs de circularité, ellipticité, solidité et g-ratio. Ensuite pour comparer ses valeurs entre différentes coupes histologiques de protocole différent, on peut soit sélectionner une région d'intérêt (ROI) soit prendre la carte sous-sous-échantillonnée au complet.

Dans ce mémoire, seule la méthode est présentée, les résultats ne sont pas présentés. Ces résultats seront présents dans l'article à paraître cet automne 2017.

### 3.4.7 Construction de l'atlas : Génération de cartes moyennes des métriques morphologiques

Une fois nos coupes histologiques segmentées pour tous les rats et tous les niveaux vertébraux que nous avons à notre disposition, nous les moyennons ensemble, i.e. entre rats et cela pour chaque niveau.

Pour minimiser la variabilité inter-sujets, une solution est de déformer et projeter la moelle épinière dans un *template* de matière blanche commun (notre atlas de référence) pour moyenner les métriques sur plusieurs sujets et ainsi créer un atlas robuste (Figure 3-10).

Le principe est le suivant : (i) Moyennage des cartes histologiques entre les rats pour chaque niveau, (ii) Recalage vers la moyenne, (iii) retour à l'étape (i) jusqu'à ce que le coefficient de corrélation entre les cartes des différents rats (pour un même segment) soit supérieure à  $\sim 0.97$ .

Deux types de transformations sont utilisés pour réaliser le recalage des cartes moyennées histologiques sur l'atlas de référence : une transformation affine ou linéaire (avec matlab) qui permet de placer le Panorama de la moelle acquise au MEB dans l'espace de l'atlas de référence, puis une transformation SyN (*Symmetric Normalization*) ou non-linéaire, qui est un algorithme de recalage déformable avec normalisation symétrique, issu du logiciel ANTs (*Advanced Normalization Tools*) qui permet le recalage d'image.

Pour résumer, la première étape consiste à appliquer une transformation affine de l'histologie sous-échantillonnée sur l'atlas de référence. On applique ensuite les paramètres de cette transformation sur l'histologie. Si la transformation affine est correcte, on sauvegarde la nouvelle carte générée dans l'espace de l'atlas. On réalise cette opération pour toutes les cartes (des différents rats) du même segment. Puis on moyenne les cartes entre elles avec une corrélation proche de 1. Et on sauvegarde la nouvelle carte moyennée entre les rats générée. Il s'agit de la première itération.

Ensuite on réalise une seconde itération, on recalcule la carte générée lors de la première itération sur chacune des cartes sous-échantillonnées des rats du même segment. On applique une transformation SyN (paramètres de recalage:  $\text{step}=1$ ,  $\text{smooth}=0.02$ ,  $\text{shrink}=15$ ,  $\text{gradStep}=0.5$ ,  $\text{iter}=100$ ) entre la carte moyennée fournie par la première itération et l'atlas de référence. On sauvegarde la nouvelle carte moyennée qui est générée. On calcule le coefficient de corrélation entre la carte moyennée

générée et l'atlas de référence. Si le coefficient est plus petit que 0.97 on réalise une troisième itération jusqu'à se rapprocher le plus de 1.

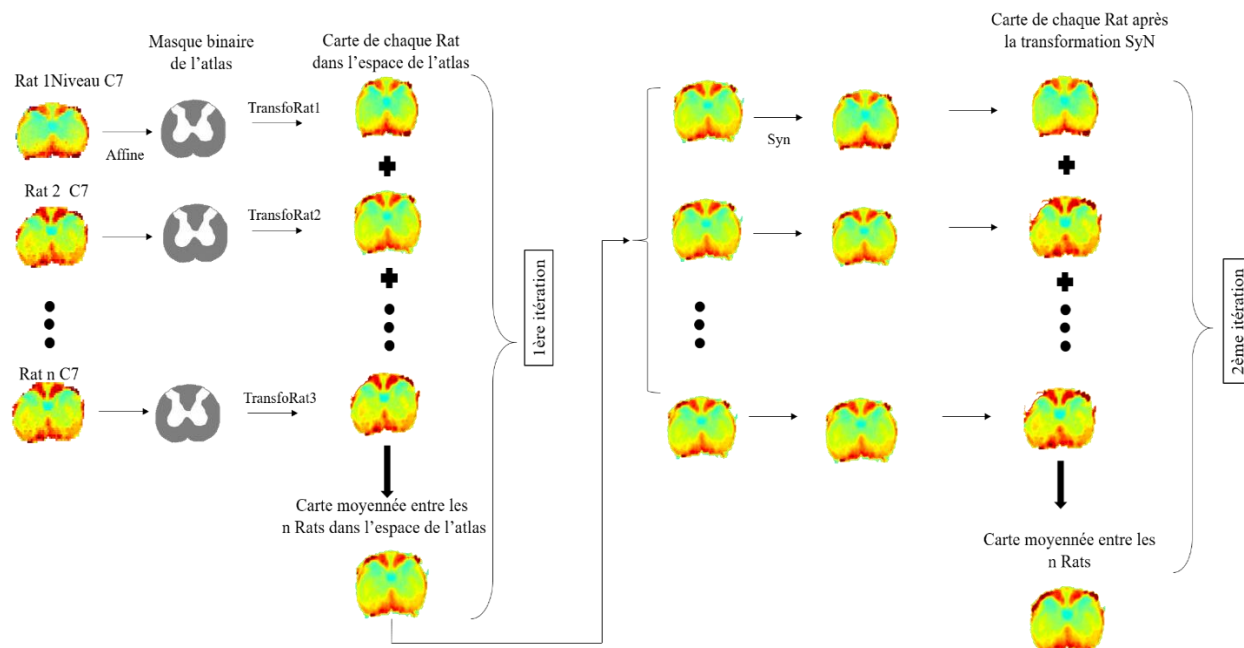


Figure 3-10 : Méthode de la construction de l'atlas de la matière blanche de la moelle épinière chez le rat.

### 3.4.8 Analyse par tractus

Une fois avoir moyenné les cartes, on extrait les métriques pour chaque tract à partir de l'atlas de référence.

Pour construire notre atlas nous avons besoin d'un *template* anatomique (atlas de référence) de la matière blanche de la moelle épinière du rat. Ce *template* a été choisi à partir de notre revue de littérature.

#### 3.4.8.1 Recalage de l'atlas de référence sur l'image histologique

On créé un masque binaire (matière blanche en blanc et matière grise en gris) de l'atlas de référence. Ensuite le masque binaire de l'atlas de référence est recalé sur les cartes moyennées d'histologie obtenues après la dernière itération de l'étape du moyennage des cartes histologiques entre rats et par niveaux vertébral. Il s'agit d'un recalage affine de l'atlas de référence sur ces cartes

histologiques moyennées. Les champs de déformations appliquées au template sont estimés par des algorithmes de recalage tel que le logiciels Antz utilisé précédemment [117].

Puis d'un recalage SyN en utilisant Antz avec les paramètres suivants : step=1, smooth=0.01, shrink=50, gradStep=0.5, iter=100 : step=2, smooth=0.01, shrink=10, gradStep=0.5, iter=100.

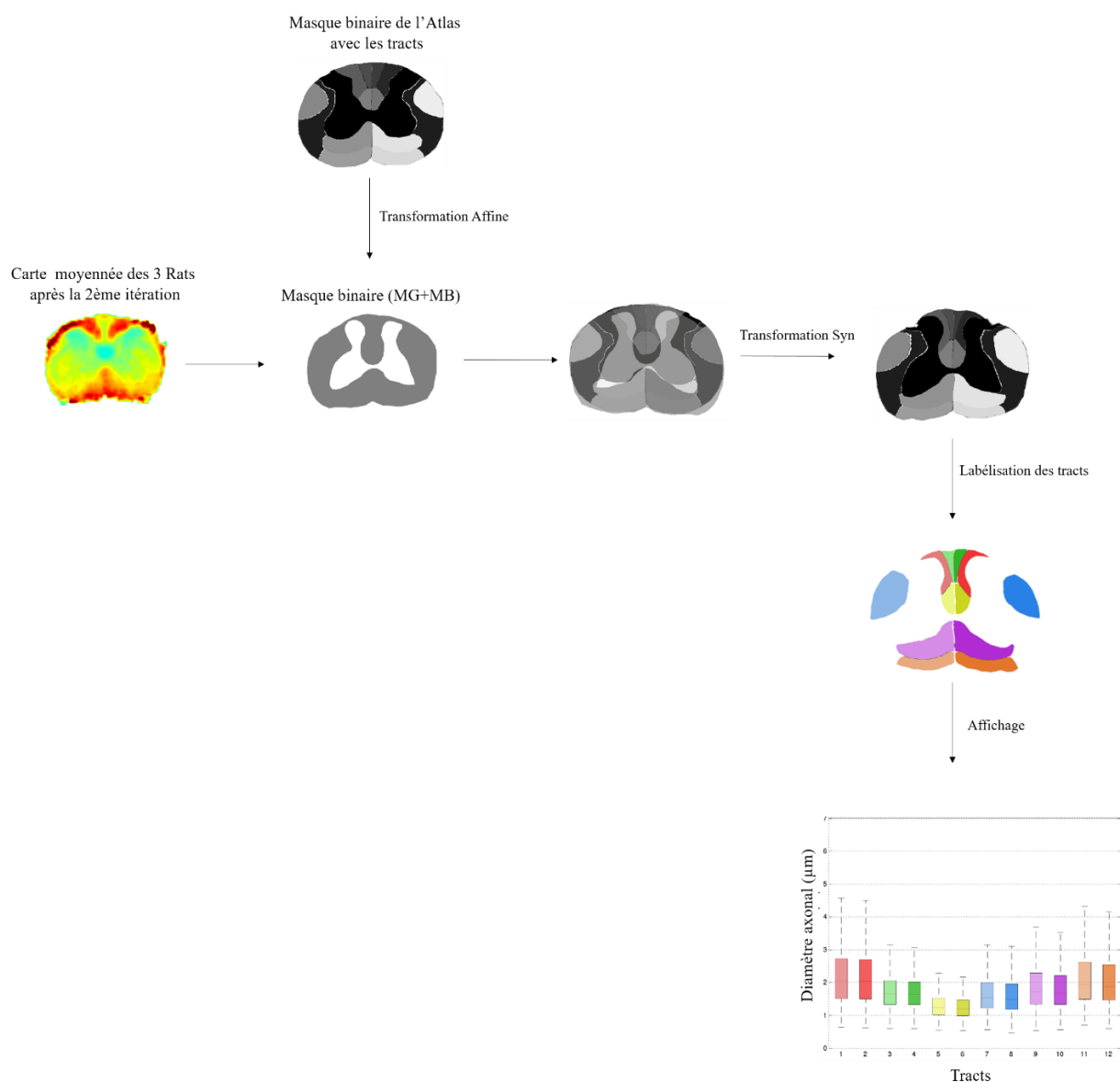


Figure 3-11 : Méthode d'extraction des métriques pour chaque tract à partir de l'atlas de référence.

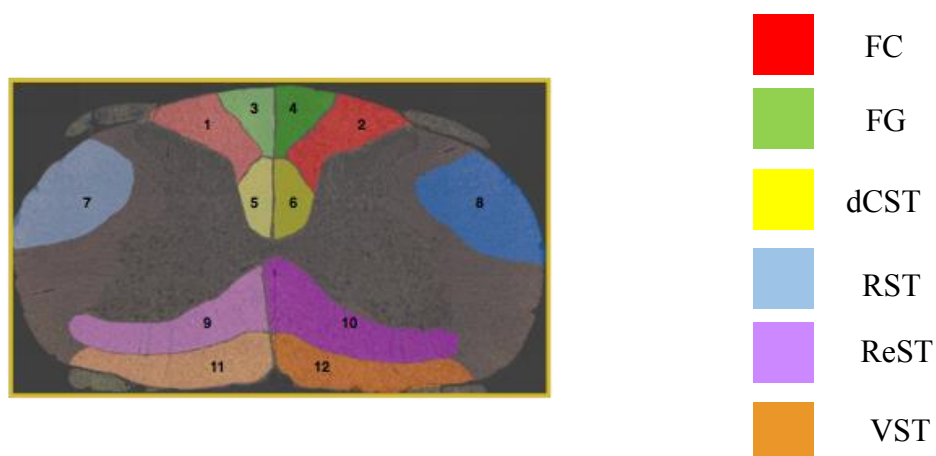


Figure 3-12 : Atlas de référence pour le recalage et l'extraction des métriques.

### 3.4.8.2 Statistiques

Pour chacune des métriques et pour chaque fenêtre de pixels  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ , on considère les mesures suivantes : diamètre axonal, densité axonale, épaisseur de la gaine de myéline et g-ratio. Pour chacune de ces métriques on calcule la moyenne et l'écart type.

- Diamètre axonal

Axonseg détecte le centroïde de chaque axone puis détermine l'aire de chaque axone en pixels. Il trouve ensuite le diamètre du cercle qu'il faut pour avoir l'aire qu'il a calculé.



Figure 3-13: Mesure du diamètre axonal par AxonSeg.

Pour calculer le diamètre axonal, AxonSeg utilise la formule de la circularité (voir plus haut) et convertit le diamètre en pixel en  $\mu\text{m}$  en connaissant la taille du pixel de chaque image. Puis après le sous-échantillonnage des cartes histologiques, chaque pixel contient la valeur moyenne de la métrique considérée.

- Densité axonale

La densité axonale est définie par la formule suivante :

$$d = \frac{\text{nombre d'axones}}{\text{Aire}_{\text{zone}}} \quad (9)$$

La structure de l'axonlist contient les positions x et y de chaque axone.

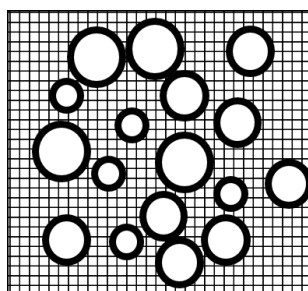


Figure 3-14 : Mesure de la densité axonale par AxonSeg.

- Épaisseur de la myéline

Une fois l'axone détecté, sa circularité est calculée. Ensuite le logiciel AxonSeg calcule l'aire totale en pixels du diamètre de la fibre (axone+myéline) pour cette valeur de circularité. Connaissant l'aire du diamètre axonal, elle est soustraite à l'aire totale de la fibre pour ainsi obtenir l'épaisseur de la gaine de myéline.

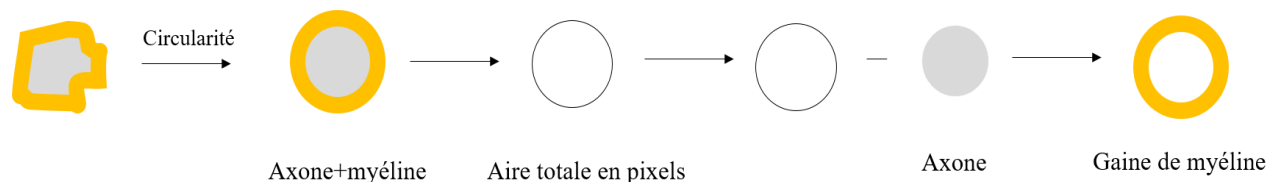


Figure 3-15 : Mesure de l'épaisseur de la gaine de myéline par AxonSeg.

- G-ratio

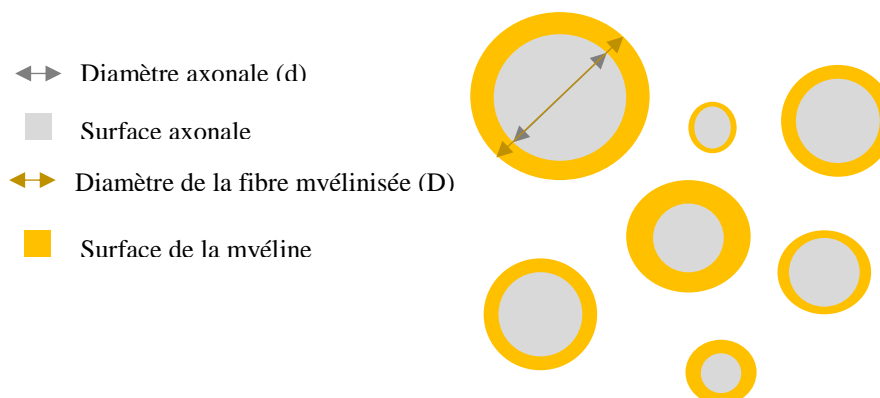


Figure 3-16 : Illustration du g-ratio.

Le g-ratio correspond au ratio du diamètre axonale  $d$  (sans la gaine de myéline) sur le diamètre de la fibre  $D$  (axone plus la gaine de myéline).



## CHAPITRE 4 RÉSULTATS

### 4.1 Données de microscopie brutes

Sur la Figure 4-1, les différentes coupes histologiques obtenues après l'acquisition au MEB et après segmentation sont affichées. Tous les niveaux vertébraux sont présentés sauf les niveaux T3 et T4, faute d'échantillons pour ces niveaux. La métrique représentée est le diamètre axonal avec une échelle de diamètre allant de 0  $\mu\text{m}$  (couleur la plus foncée : noire) à 8  $\mu\text{m}$  (couleur la plus claire : blanc).

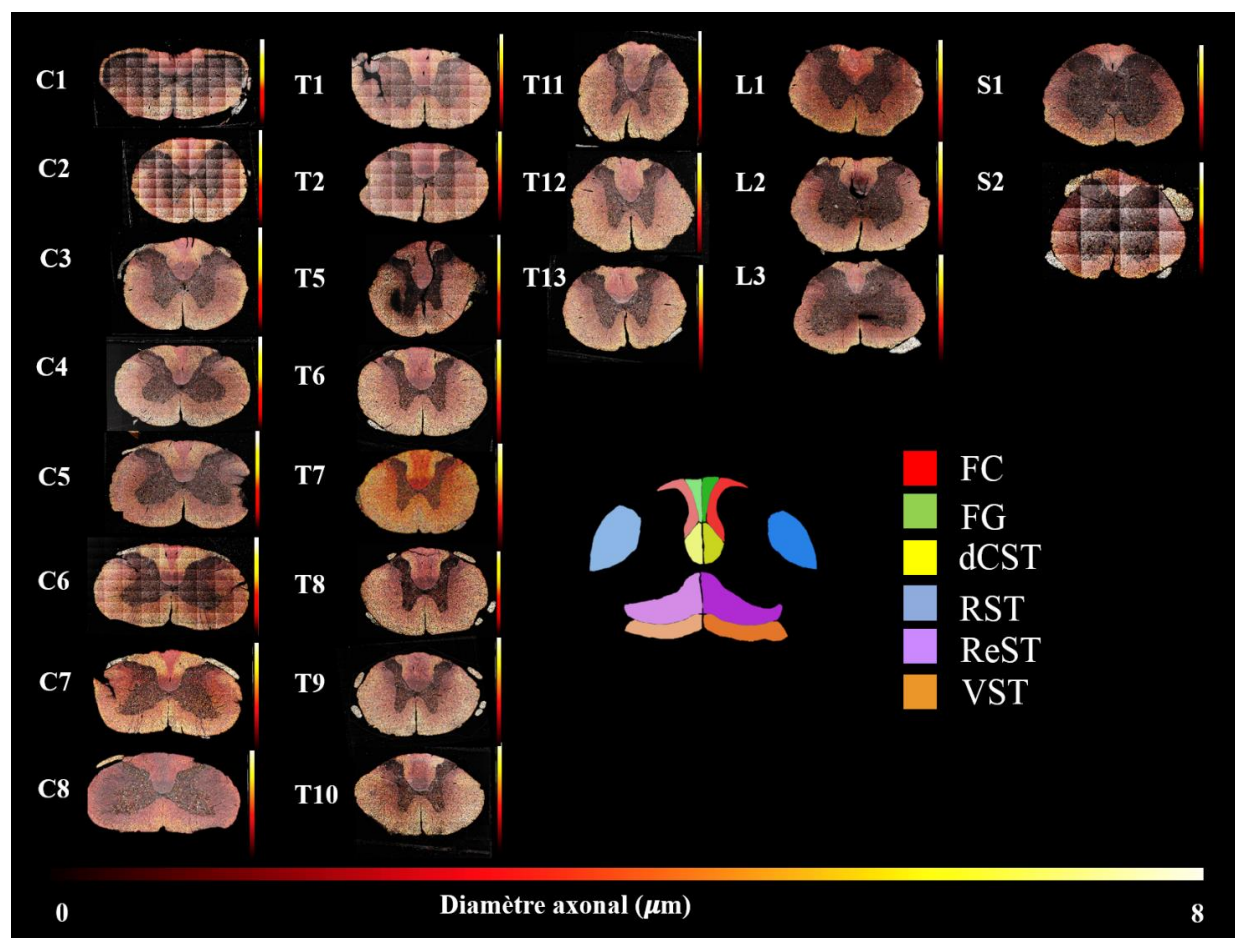


Figure 4-1 : Coupes histologiques segmentées des niveaux vertébraux.

Nous pouvons observer, d'après la Figure 4-1, que les axones de plus petits diamètre sont situés dans les tracts suivants : dCST et FG et les plus gros axones sont situés en périphérie de la matière blanche, i.e. dans le VST et le RST.

Nous pouvons aussi remarquer que ces observations sont consistantes le long des niveaux vertébraux.

## 4.2 Validation de la segmentation

Il est important de s'assurer que la segmentation des images histologiques est robuste. La Figure 4-2 présente, pour chacun des 12 tracts, une zone observée au MEB et en dessous, la superposition de la segmentation manuelle et de la segmentation automatique par AxonSeg. Les axones en blanc correspondent aux axones identifiés à la fois par la segmentation manuelle et par AxonSeg.

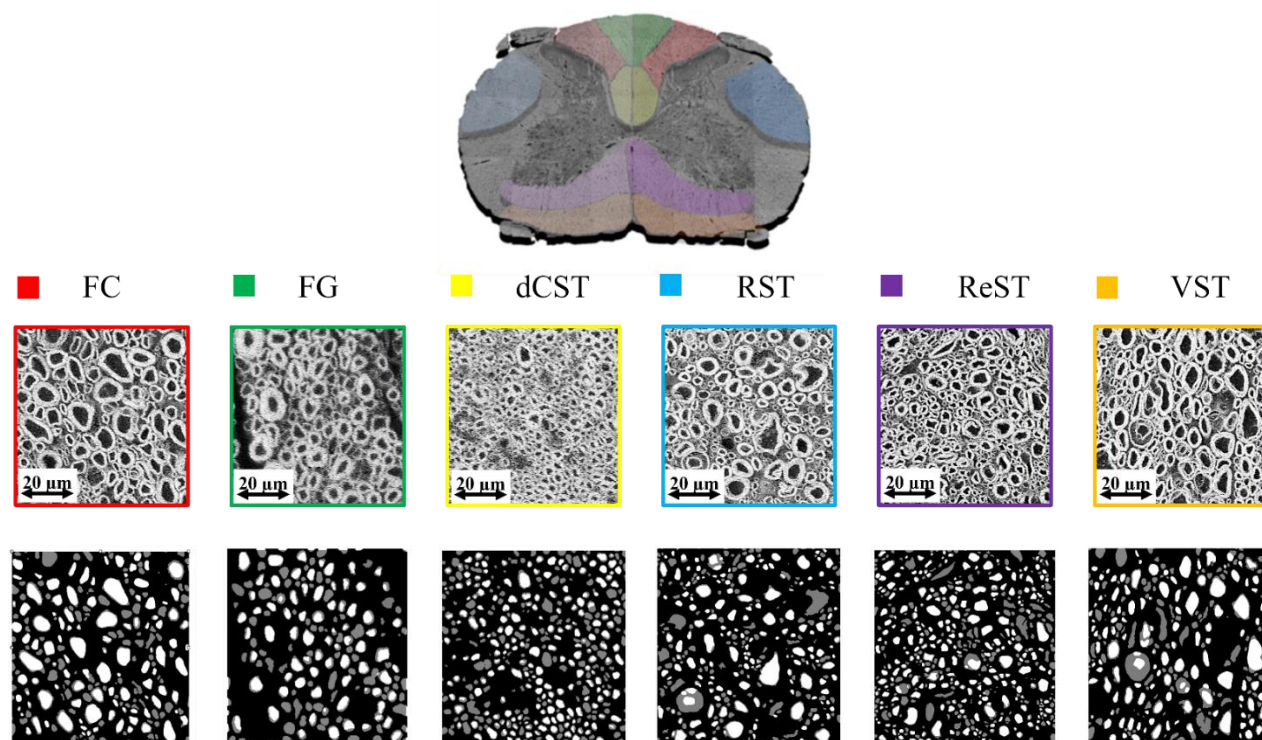


Figure 4-2 : Validation de la segmentation automatique par AxonSeg.

Les résultats de la segmentation sont données dans le Tableau 4-1.

Tableau 4-1 : Résultats de la validation de la segmentation par AxonSeg.

	FC	FG	dCST	RST	ReST	VST
D moyen	0.81	0.78	0.71	0.79	0.75	0.81
Sensibilité	0.82	0.82	0.85	0.87	0.81	0.82
Précision	0.87	0.50	0.58	0.57	0.57	0.52

AxonSeg est capable de détecter la plupart des vrais axones avec une sensibilité de 0.8 et plus. De plus AxonSeg segmente presque autant d'axones que la segmentation manuelle avec un dice allant de 0.71 à 0.81.

### 4.3 Identification des niveaux vertébraux par reconnaissance de forme

Une fois notre coupe histologique segmentée, elle est labélisée, pour savoir à quel niveau vertébral elle appartient. Les Figures 4-3 et 4-4 présentent les résultats de cette labélisation de nos différents échantillons. L'axe des ordonnées correspond au niveau réel auquel appartient l'échantillon (valeur vraie) et l'axe des abscisses correspond au niveau prédit par notre algorithme.

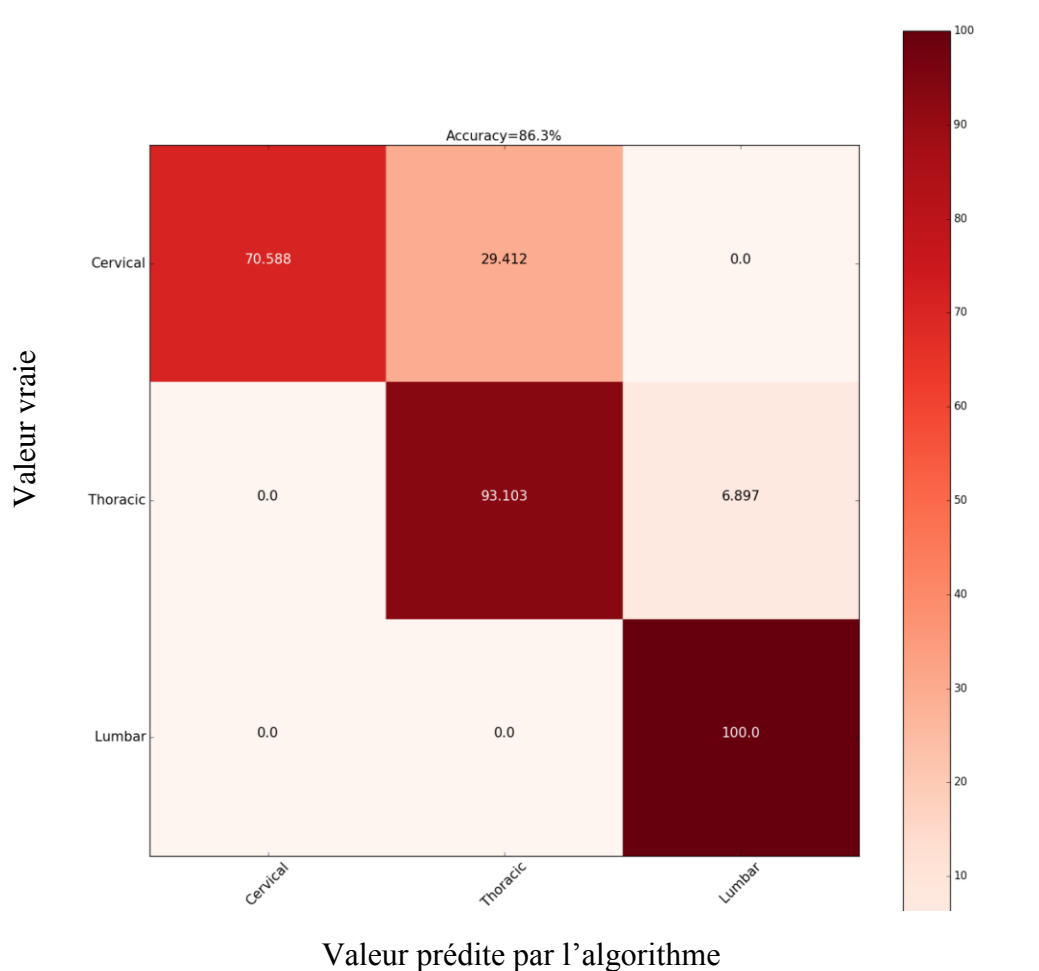


Figure 4-3 : Résultats de l'identification des niveaux vertébraux : prédiction et exactitude.

La Figure 4-3 présente les résultats de la labélisation de nos échantillons pour les niveaux cervical, thoracique et lombaire tandis que la Figure 4-4 présente les résultats de la labélisation pour chacun des niveaux (C1, C2, C3 ...).

Nous avons obtenu une précision de 86.3%, i.e. qu'à 86.3% nos échantillons ont bien été labélisés dans leur famille correspondante (C, T ou L).

Nous avons obtenu une précision de 74.5% (Figure 4-4) lorsque nous voulions savoir précisément à quel niveau appartenait notre échantillon.

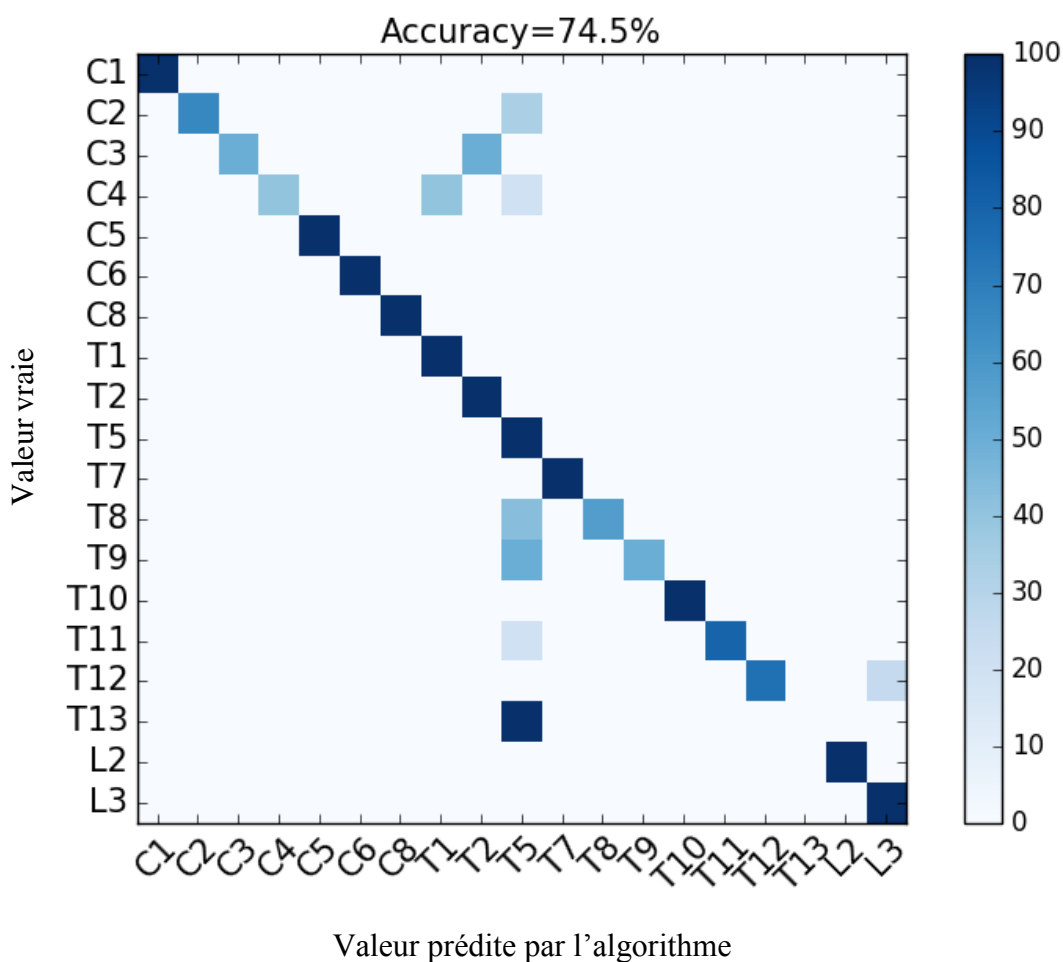


Figure 4-4 : Résultats de l'identification des niveaux : prédiction et exactitude.

#### 4.4 Cartes moyennes de la microstructure chez le rat

Dans cette section, les cartes moyennes, obtenues entre les rats le long des niveaux vertébraux, pour les différentes métriques sont présentées.

#### 4.4.1 Diamètre axonal

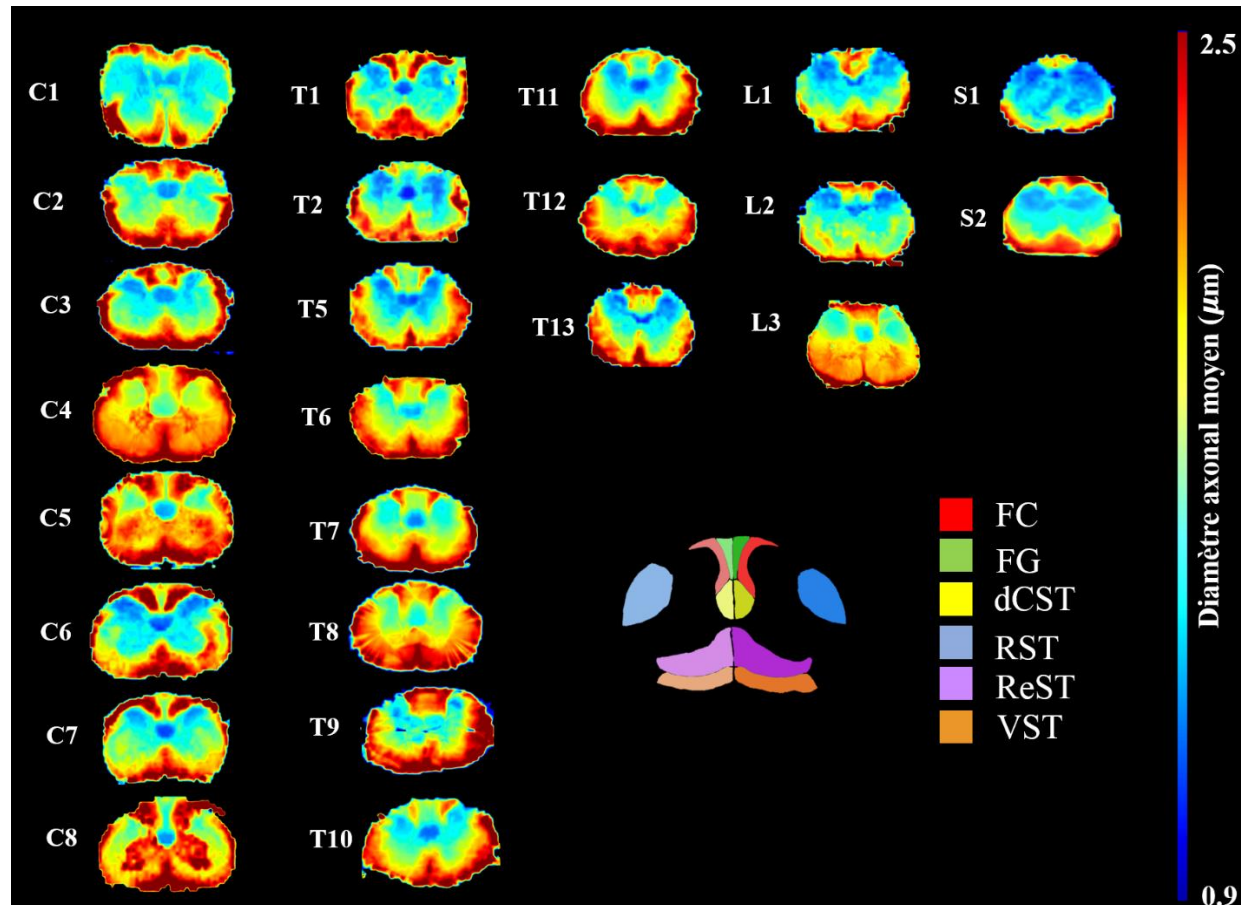


Figure 4-5 : Cartes moyennées pour le diamètre axonal le long des niveaux vertébraux entre les rats.

Le code couleur de la Figure 4-5 est le suivant : les régions en bleu sont les régions dans lesquelles le diamètre axonal est le plus faible et les régions en rouge sont les régions dans lesquelles le diamètre axonal est le plus élevé.

Nous pouvons observer sur la Figure 4-5, que les plus petits axones sont situés dans les tracts suivants : dCST, FG et en périphérie de la matière grise, et que les plus gros axones sont situés en périphérie de la matière blanche (VST, ReST et RST). Ces observations sont consistantes entre les rats et le long des niveaux vertébraux.

#### 4.4.2 Densité axonale

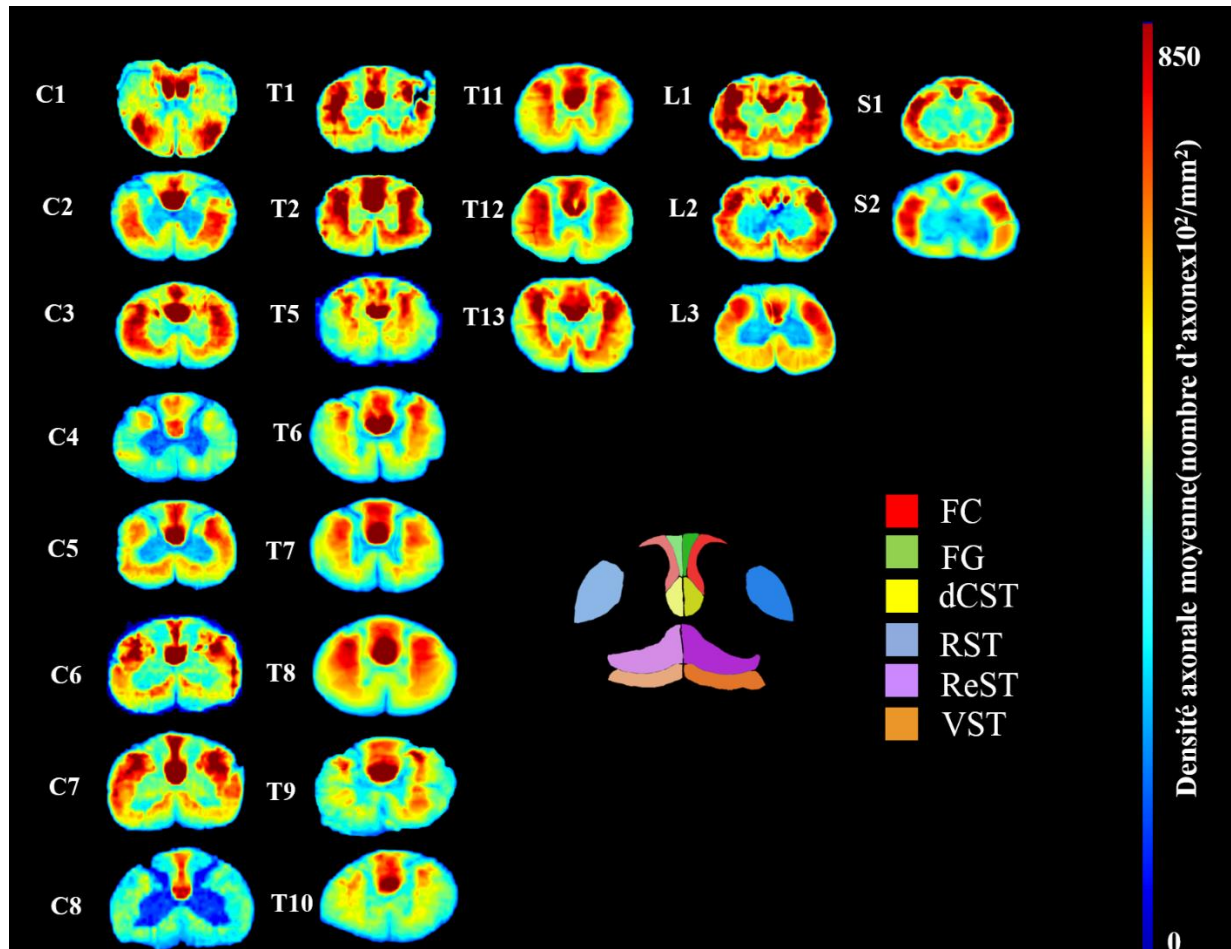


Figure 4-6 : Cartes moyennées pour la densité axonale le long des niveaux vertébraux entre les rats.

Le code couleur de la Figure 4-6 est le suivant : les régions en bleu sont les régions dans lesquelles la densité axonale est la plus faible et les régions en rouge sont les régions dans lesquelles la densité axonale est la plus élevée.

Nous observons sur la Figure 4-6 que la densité axonale est la plus faible pour les tracts situés en périphérie de la matière blanche tels que les tracts VST et ReST. La densité axonale est la plus élevée pour les tracts dCST, FG et les régions situées en périphérie de la matière grise.

Ces observations sont consistantes entre les rats et le long des niveaux vertébraux.

### 4.4.3 G-ratio

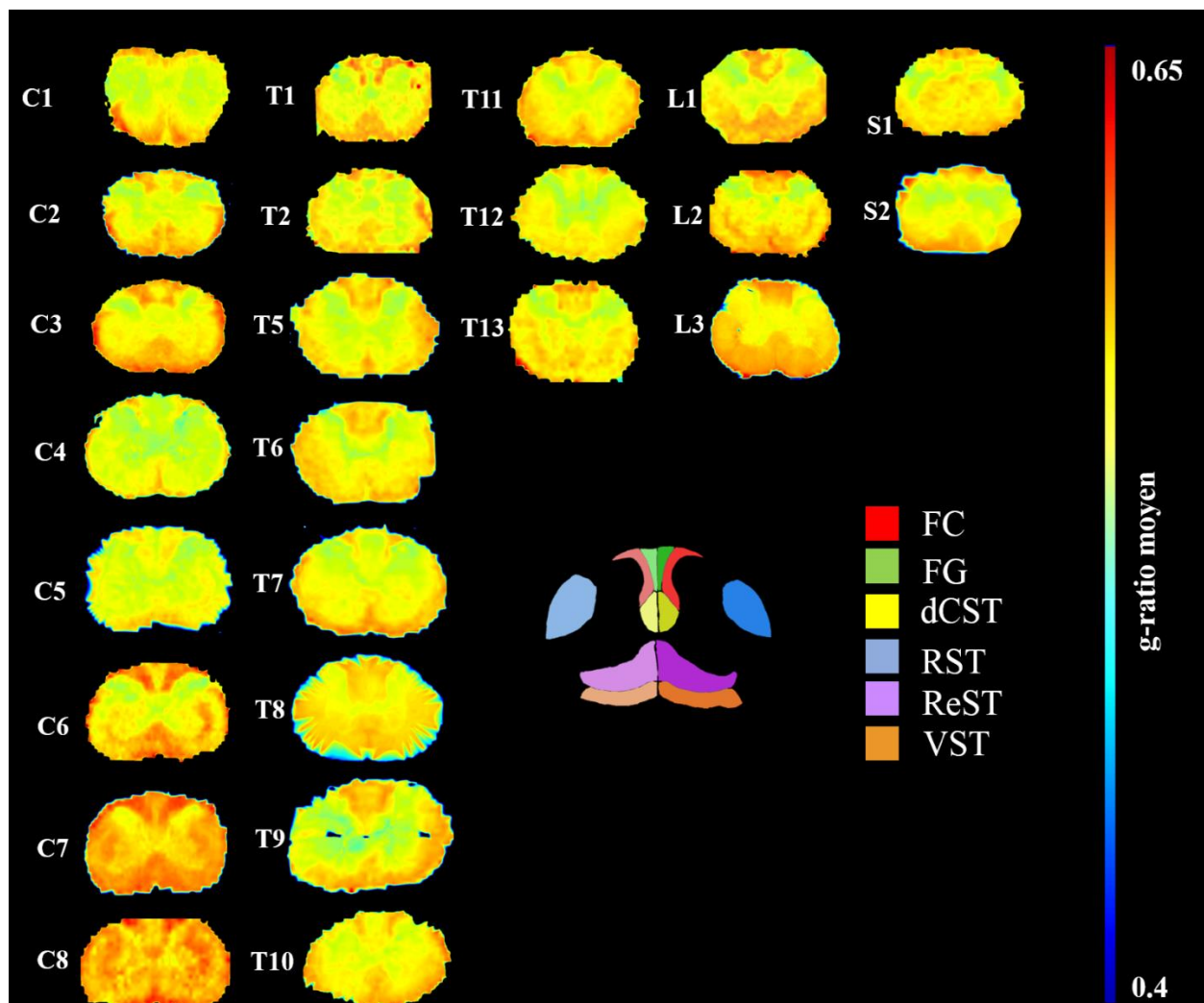


Figure 4-7 : Cartes moyennées pour le g-ratio le long des niveaux vertébraux entre les rats.

Le code couleur de la Figure 4-7 est le suivant : les régions en bleu sont les régions dans lesquelles le g-ratio est le plus faible et les régions en rouge sont les régions dans lesquelles le g-ratio est le plus élevé.

Nous observons que le g-ratio est constant dans toute la matière blanche et cette observation est consistante entre les rats et le long des niveaux vertébraux.

## 4.5 Analyse par tractus

Une analyse par tractus est ensuite menée pour étudier la variabilité des différentes métriques entre les rats.

### 4.5.1 Diamètre axonal

Pour le diamètre axonal, les valeurs sont répertoriées dans les Tableau 4-2 et Tableau 4-3. Notons que les lettres *g* et *d* dans les tableaux ci-dessus signifient respectivement *gauche* et *droite*.

Tableau 4-2 : Diamètre axonal moyen le long des vertèbres cervicales.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
FC g	1,76	2,07	2,06	2,33	2,31	2,26	2,15	2,34
FC d	1,80	2,07	2,12	2,19	2,23	2,17	1,99	2,23
FG g	1,91	1,98	2,03	1,93	1,93	1,95	1,85	1,90
FG d	1,88	2,00	1,87	1,84	1,90	1,97	1,76	1,65
dCST g	1,43	1,36	1,38	1,63	1,59	1,41	1,33	1,53
dCST d	1,47	1,36	1,35	1,61	1,56	1,41	1,34	1,49
RST g	1,62	1,94	1,93	2,21	2,00	1,90	1,75	1,95
RST d	1,58	1,90	1,91	2,26	2,00	1,85	1,81	2,00
ReST g	1,73	1,94	1,97	2,25	2,11	2,21	2,00	2,08
ReST d	1,76	1,96	1,95	2,28	2,05	2,08	1,98	2,14
VST g	2,08	2,37	2,56	2,77	2,49	2,59	2,36	2,52
VST d	2,09	2,39	2,57	2,69	2,44	2,40	2,30	2,42

Dans le tableau ci-dessous nous observons bien les tendances que nous avons pu voir dans les cartes moyennées plus haut. En effet les plus petits axones se trouvent dans les tracts dCST dans les niveaux cervicaux, et les plus gros axones sont situés dans les tracts VST et FC.

Nous pouvons aussi remarquer que les valeurs de diamètre axonal pour un tract donné à gauche et à droite sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts.

De plus l'écart type nous informe sur la dispersion de nos métriques au sein des tracts. Ainsi dans le Tableau 4-3 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.



Tableau 4-3 : Écart type du diamètre axonal moyen le long des vertèbres cervicales.

	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>	<b>C7</b>	<b>C8</b>
FC g	0,24	0,28	0,29	0,26	0,16	0,30	0,26	0,16
FC d	0,27	0,28	0,30	0,25	0,20	0,31	0,27	0,32
FG g	0,19	0,18	0,17	0,14	0,17	0,10	0,10	0,21
FG d	0,12	0,15	0,12	0,10	0,14	0,13	0,10	0,10
dCST g	0,10	0,05	0,06	0,08	0,20	0,19	0,12	0,18
dCST d	0,11	0,04	0,04	0,09	0,20	0,19	0,13	0,15
RST g	0,14	0,34	0,36	0,25	0,19	0,27	0,21	0,24
RST d	0,12	0,26	0,38	0,34	0,25	0,37	0,31	0,26
ReST g	0,14	0,15	0,15	0,15	0,11	0,23	0,14	0,18
ReST d	0,15	0,16	0,16	0,16	0,13	0,22	0,15	0,18
VST g	0,23	0,18	0,22	0,31	0,19	0,24	0,18	0,34
VST d	0,22	0,18	0,21	0,26	0,21	0,27	0,23	0,43

Nous reportons également les valeurs du diamètre axonal pour les niveaux thoraciques, lombaires et sacraux.

Tableau 4-4 : Diamètre axonal moyen le long des vertèbres thoraciques.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>	<b>T10</b>	<b>T11</b>	<b>T12</b>	<b>T13</b>
FCT g	2,14	1,69	1,86	2,01	2,05	2,07	2,38	2,01	1,88	1,92	1,96
FCT d	2,13	1,74	1,78	2,02	2,06	2,10	2,31	1,92	1,91	1,96	1,91
FGT g	1,92	1,57	1,63	1,90	1,93	2,01	2,42	1,83	1,79	1,90	2,02
FGT d	1,90	1,61	1,75	1,86	1,90	1,93	2,35	1,81	1,78	1,87	2,02
dCST g	1,50	1,26	1,41	1,51	1,47	1,60	1,69	1,42	1,38	1,54	1,44
dCST d	1,45	1,25	1,41	1,53	1,51	1,66	1,78	1,43	1,41	1,48	1,47
RST g	1,65	1,86	2,06	1,97	2,01	2,01	2,45	2,19	2,09	1,87	1,71
RST d	1,82	1,85	1,91	2,03	2,09	2,08	2,01	2,06	1,97	1,96	1,89
ReST g	1,88	1,73	1,85	2,02	2,03	2,11	2,13	2,10	1,95	2,07	1,82
ReST d	2,02	1,96	1,80	1,98	2,10	2,11	2,01	2,07	1,92	2,00	1,94
VST g	2,22	2,07	2,13	2,41	2,60	2,42	2,63	2,55	2,56	2,40	2,10
VST d	2,22	2,14	2,09	2,34	2,67	2,35	2,69	2,35	2,51	2,39	2,24

Dans le tableau ci-dessus nous observons bien les tendances que nous avons pu voir dans les cartes moyennées plus haut. En effet les plus petits axones se trouvent dans les tracts dCST dans les niveaux thoraciques, et les plus gros axones sont situés dans les tracts VST et FC.

Nous pouvons aussi remarquer que les valeurs de diamètre axonal pour un tract donné à gauche et à droite sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les

différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-5 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-5 : Écart type du diamètre axonal moyen le long des vertèbres thoraciques.

	T1	T2	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
FCT g	0,18	0,16	0,22	0,18	0,20	0,16	0,22	0,21	0,16	0,20	0,22
FCT d	0,20	0,19	0,18	0,18	0,19	0,15	0,30	0,16	0,19	0,18	0,25
FGT g	0,10	0,14	0,22	0,13	0,14	0,09	0,17	0,10	0,15	0,23	0,17
FGT d	0,13	0,15	0,07	0,09	0,12	0,11	0,19	0,08	0,16	0,19	0,19
dCST g	0,26	0,09	0,16	0,13	0,12	0,09	0,22	0,10	0,12	0,14	0,22
dCST d	0,22	0,09	0,18	0,13	0,14	0,11	0,18	0,10	0,12	0,11	0,20
RST g	0,25	0,43	0,20	0,23	0,33	0,24	0,36	0,37	0,32	0,21	0,23
RST d	0,30	0,40	0,20	0,19	0,35	0,25	0,30	0,26	0,27	0,24	0,22
ReST g	0,22	0,14	0,13	0,15	0,15	0,15	0,19	0,16	0,16	0,14	0,11
ReST d	0,24	0,17	0,15	0,13	0,20	0,13	0,25	0,20	0,17	0,14	0,15
VST g	0,14	0,17	0,28	0,18	0,26	0,14	0,22	0,16	0,24	0,18	0,23
VST d	0,14	0,16	0,28	0,15	0,27	0,19	0,26	0,22	0,23	0,14	0,25

Tableau 4-6 : Diamètre axonal moyen (à gauche) et écart type du diamètre axonal moyen (à droite) le long des vertèbres lombaires.

	L1	L2	L3		L1	L2	L3
FCT g	1,86	1,83	1,95	FCT g	0,20	0,34	0,18
FCT d	1,88	1,83	2,02	FCT d	0,23	0,29	0,27
FGT g	2,03	1,86	2,08	FGT g	0,18	0,22	0,17
FGT d	2,06	1,87	2,10	FGT d	0,11	0,25	0,20
dCST g	1,49	1,40	1,53	dCST g	0,26	0,13	0,09
dCST d	1,55	1,34	1,56	dCST d	0,30	0,08	0,08
RST g	1,65	1,62	1,74	RST g	0,23	0,24	0,13
RST d	1,59	1,60	1,78	RST d	0,13	0,21	0,14
ReST g	1,85	1,74	2,01	ReST g	0,10	0,07	0,05
ReST d	1,81	1,82	2,05	ReST d	0,11	0,11	0,06
VST g	2,20	2,08	2,22	VST g	0,13	0,23	0,24
VST d	2,04	2,13	2,25	VST d	0,14	0,28	0,25

Dans le tableau ci-dessus nous observons bien les tendances que nous avons pu voir dans les cartes moyennées plus haut. En effet les plus petits axones se trouvent dans les tracts dCST dans les niveaux lombaires, et les plus gros axones sont situés dans les tracts VST et FC.

Nous pouvons aussi remarquer que les valeurs de diamètre axonal pour un tract donné à gauche et à droite sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-6 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-7 : Diamètre axonal moyen (à gauche) et écart type du diamètre axonal moyen (à droite) du le long des vertèbres sacrales.

	<b>S1</b>	<b>S2</b>		<b>S1</b>	<b>S2</b>
FCT g	1,64	2,22	FCT g	0,24	0,40
FCT d	1,65	1,99	FCT d	0,25	0,28
FGT g	1,80	1,95	FGT g	0,19	0,22
FGT d	1,81	1,92	FGT d	0,23	0,19
dCST g	1,32	1,47	dCST g	0,07	0,04
dCST d	1,27	1,56	dCST d	0,09	0,09
RST g	1,40	1,60	RST g	0,11	0,14
RST d	1,47	1,67	RST d	0,14	0,24
ReST g	1,77	1,98	ReST g	0,11	0,12
ReST d	1,66	1,98	ReST d	0,08	0,12
VST g	2,07	2,22	VST g	0,31	0,20
VST d	1,83	2,24	VST d	0,25	0,16

Dans le tableau ci-dessus nous observons bien les tendances que nous avons pu voir dans les cartes moyennées plus haut. En effet les plus petits axones se trouvent dans les tracts dCST dans les niveaux sacraux, et les plus gros axones sont situés dans les tracts VST et FC.

Nous pouvons aussi remarquer que les valeurs de diamètre axonal pour un tract donné à gauche et à droite sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-7 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Sur la Figure 4-8, nous trouverons la dispersion du diamètre axonal le long de tous les niveaux.

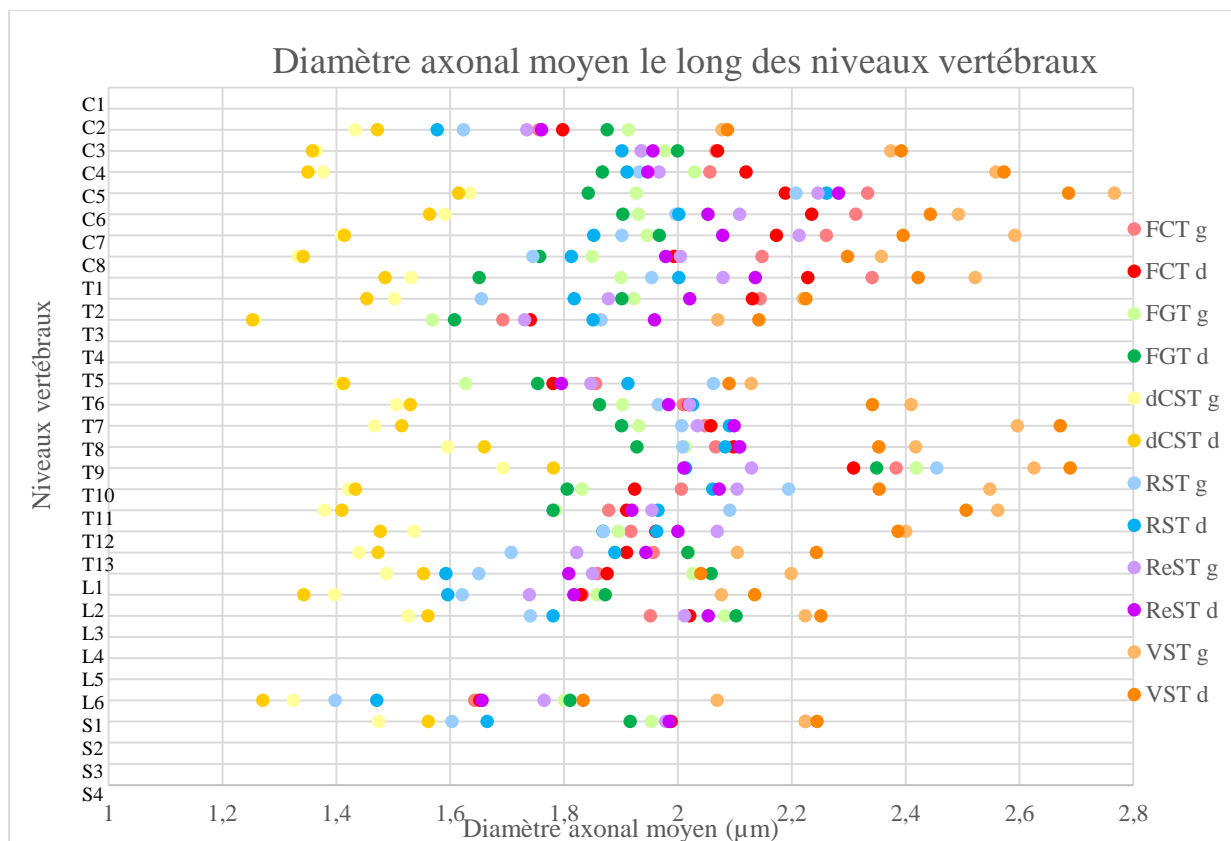


Figure 4-8 : Diamètre axonal des cartes moyennées le long des niveaux vertébraux entre les rats avec g pour gauche et d pour droite.

#### 4.5.2 Densité axonale

Pour la densité axonale, on répertorie les valeurs de densité axonale moyenne (en nombre d'axone  $\times 100 \mu\text{m}^2$ ) et son écart type par tract le long des niveaux vertébraux et entre rats.

Dans le tableau ci-dessous nous observons bien les tendances que nous avons pu voir dans les cartes moyennées plus haut. En effet les zones les plus denses de la matière blanche se trouvent dans les tracts dCST et FC dans les niveaux cervicaux, et les zones les moins denses sont situées dans les tracts RST et VST.

Nous pouvons aussi remarquer que les valeurs de la densité axonale moyenne pour un tract donné à gauche et à droite sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-9 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-8 : Densité axonale moyenne le long des vertèbres cervicales.

	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>	<b>C7</b>	<b>C8</b>
FCT g	693	550	565	401	369	524	531	319
FCT d	722	519	574	474	390	564	609	355
FGT g	675	647	659	535	546	676	751	465
FGT d	625	568	757	592	554	671	846	611
dCST g	754	1030	1003	526	720	1110	1247	629
dCST d	666	1006	1135	577	721	1152	1216	661
RST g	384	515	621	391	478	656	636	355
RST d	385	435	631	354	390	612	671	332
ReST g	633	551	545	405	438	507	527	369
ReST d	587	517	556	367	438	542	522	370
VST g	560	407	357	269	328	345	363	245
VST d	533	384	338	262	346	400	396	257

Tableau 4-9 : Écart type de la densité axonale moyenne le long des vertèbres cervicales.

	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>	<b>C7</b>	<b>C8</b>
FCT g	200	168	138	71	62	145	127	46
FCT d	212	142	176	113	78	152	176	83
FGT g	150	147	113	61	87	169	125	101
FGT d	144	135	103	57	100	183	146	109
dCST g	374	180	301	144	173	249	319	126
dCST d	302	163	247	141	177	303	363	115
RST g	67	116	154	64	104	159	195	52
RST d	98	135	155	98	122	212	150	61
ReST g	151	74	68	52	43	71	64	51
ReST d	140	77	86	39	73	92	74	55
VST g	121	59	57	76	73	70	79	58
VST d	112	54	68	68	85	75	78	64

Pour les vertèbres thoraciques (Tableau 4-10 et Tableau 4-11) nous faisons les mêmes observations que pour les vertèbres cervicales : les zones les plus denses de la matière blanche se trouvent dans les tracts dCST et FC dans les niveaux cervicaux, et les zones les moins denses sont situées dans les tracts RST et VST.

Nous pouvons aussi remarquer que les valeurs de la densité axonale moyenne pour un tract donné à gauche et à droite sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-11 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-10 : Densité axonale moyenne le long des vertèbres thoraciques.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>	<b>T10</b>	<b>T11</b>	<b>T12</b>	<b>T13</b>
FCT g	612	713	495	486	563	577	509	511	623	609	624
FCT d	584	726	572	500	530	548	564	512	556	568	575
FGT g	696	946	621	599	672	614	603	609	688	692	582
FGT d	747	920	587	623	675	607	634	606	674	679	602
dCST g	1071	1177	801	970	919	1003	902	732	954	716	993
dCST d	1113	1198	883	900	842	971	902	719	885	816	916
RST g	461	586	427	520	508	549	424	401	489	612	649
RST d	712	631	435	462	491	562	409	418	518	572	551
ReST g	608	646	484	479	487	523	532	426	536	525	626
ReST d	561	561	469	454	478	525	428	413	542	558	569
VST g	422	423	302	318	330	367	355	294	339	394	484
VST d	418	400	299	340	322	362	320	286	346	380	395

Tableau 4-11 : Écart type de la densité axonale moyenne le long des vertèbres thoraciques.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>	<b>T10</b>	<b>T11</b>	<b>T12</b>	<b>T13</b>
FCT g	108	175	124	140	128	126	112	94	115	105	134
FCT d	136	175	111	134	127	124	132	105	106	115	120
FGT g	159	142	136	133	131	146	92	77	119	144	112
FGT d	120	140	104	123	125	148	81	76	117	169	122
dCST g	321	288	284	272	175	163	253	162	217	156	213
dCST d	326	286	279	246	223	165	209	144	217	184	247
RST g	284	244	85	119	129	139	83	92	117	118	153
RST d	221	226	111	99	126	150	133	99	113	133	155
ReST g	83	96	69	66	68	60	76	43	60	60	66
ReST d	104	102	64	62	78	62	70	48	62	89	74
VST g	65	96	63	86	72	80	79	59	80	94	94
VST d	79	91	71	74	74	84	61	73	77	96	103

Pour les vertèbres lombaires (Tableau 4-12) nous faisons les mêmes observations que pour les vertèbres cervicales et thoraciques : les zones les plus denses de la matière blanche se trouvent dans

les tracts dCST et FC dans les niveaux cervicaux, et les zones les moins denses sont situées dans les tracts RST et VST.

Nous pouvons aussi remarquer que les valeurs de la densité axonale moyenne pour un tract donné à gauche et à droite sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-12 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-12 : Densité axonale moyenne (à gauche) et écart type de la densité axonale moyenne (à droite) le long des vertèbres lombaires.

	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>		<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>
FCT g	610	503	493	FCT g	149	160	96
FCT d	573	554	470	FCT d	144	144	137
FGT g	609	552	511	FGT g	143	116	101
FGT d	592	567	508	FGT d	118	134	116
dCST g	950	229	632	dCST g	260	176	177
dCST d	910	441	627	dCST d	271	212	162
RST g	755	684	683	RST g	184	191	103
RST d	745	649	622	RST d	232	188	132
ReST g	641	624	533	ReST g	68	71	69
ReST d	630	542	513	ReST d	90	101	73
VST g	466	434	504	VST g	82	129	95
VST d	513	384	483	VST d	118	133	107

Pour les vertèbres sacrales (Tableau 4-13) nous faisons les mêmes observations que pour les vertèbres cervicales, thoraciques et lombaires : les zones les plus denses de la matière blanche se trouvent dans les tracts dCST et FC dans les niveaux cervicaux, et les zones les moins denses sont situées dans les tracts RST et VST.

Nous pouvons aussi remarquer que les valeurs de la densité axonale moyenne pour un tract donné à gauche et à droite sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-13 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-13 : Densité axonale moyenne (à gauche) et écart type de la densité axonale moyenne (à droite) le long des vertèbres sacrales.

	S1	S2		S1	S2
FCT g	601	408	FCT g	144	161
FCT d	595	362	FCT d	178	121
FGT g	706	545	FGT g	162	157
FGT d	666	514	FGT d	163	175
dCST g	580	556	dCST g	170	161
dCST d	698	510	dCST d	217	114
RST g	765	644	RST g	140	144
RST d	690	601	RST d	198	161
ReST g	574	420	ReST g	74	86
ReST d	608	398	ReST d	48	80
VST g	438	395	VST g	122	86
VST d	432	403	VST d	160	83

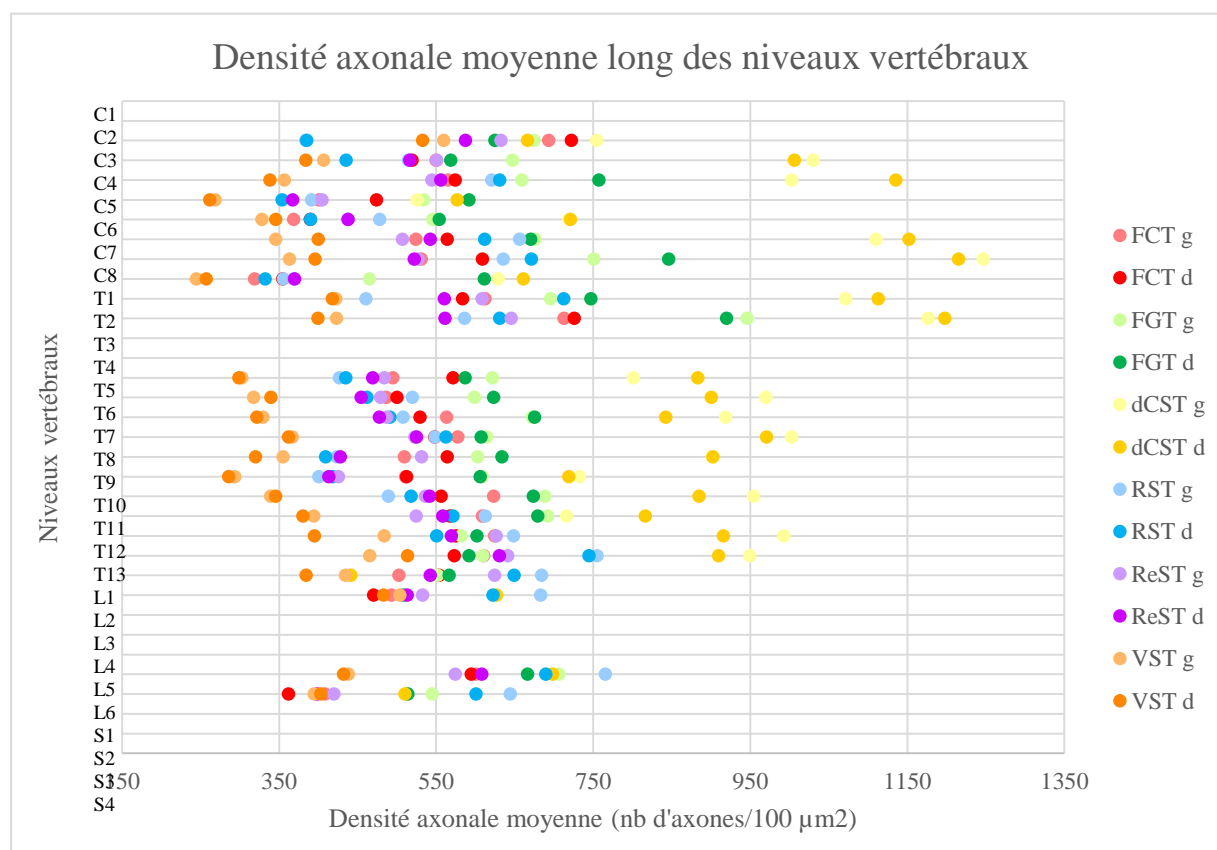


Figure 4-9 : Densité axonale des cartes moyennées le long des niveaux vertébraux entre les rats avec g pour gauche et d pour droite.



### 4.5.3 Épaisseur de la gaine de myéline

Dans le Tableau 4-14 nous observons que l'épaisseur de la gaine de myéline est la plus petite dans les dCST dans les niveaux cervicaux, et elle est la plus élevée dans les tracts RST, ReST et VST.

Nous pouvons aussi remarquer que ses valeurs, pour un tract donné à gauche et à droite, sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-15 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-14 : Épaisseur moyenne de la gaine de myéline le long des vertèbres cervicales.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
FCT g	0,69	0,78	0,74	0,93	0,87	0,81	0,74	0,92
FCT d	0,70	0,76	0,76	0,90	0,86	0,80	0,71	0,90
FGT g	0,75	0,79	0,76	0,82	0,79	0,76	0,68	0,81
FGT d	0,72	0,80	0,73	0,79	0,80	0,77	0,65	0,74
dCST g	0,60	0,57	0,56	0,71	0,65	0,58	0,51	0,67
dCST d	0,62	0,57	0,55	0,71	0,64	0,58	0,52	0,65
RST g	0,67	0,74	0,71	0,92	0,81	0,74	0,64	0,84
RST d	0,66	0,75	0,71	0,90	0,79	0,72	0,65	0,86
ReST g	0,67	0,72	0,72	0,90	0,83	0,79	0,72	0,88
ReST d	0,68	0,73	0,71	0,91	0,81	0,74	0,71	0,91
VST g	0,73	0,84	0,86	1,03	0,90	0,88	0,81	0,97
VST d	0,74	0,84	0,86	1,01	0,89	0,84	0,79	0,95

Tableau 4-15 : Écart type de l'épaisseur moyenne de la gaine de myéline le long des vertèbres cervicales.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
FCT g	0,07	0,09	0,08	0,07	0,05	0,08	0,07	0,04
FCT d	0,07	0,08	0,08	0,06	0,06	0,08	0,07	0,10
FGT g	0,06	0,05	0,04	0,05	0,06	0,03	0,02	0,07
FGT d	0,03	0,05	0,03	0,04	0,05	0,04	0,03	0,04
dCST g	0,04	0,02	0,02	0,03	0,08	0,06	0,04	0,09
dCST d	0,04	0,02	0,02	0,03	0,08	0,06	0,05	0,08
RST g	0,05	0,08	0,08	0,07	0,06	0,07	0,07	0,08
RST d	0,04	0,07	0,09	0,11	0,08	0,09	0,08	0,08
ReST g	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,05	0,04	0,05
ReST d	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05
VST g	0,04	0,04	0,04	0,07	0,06	0,04	0,05	0,12
VST d	0,04	0,04	0,04	0,06	0,06	0,05	0,06	0,12

De même, dans le Tableau 4-16 nous observons que l'épaisseur de la gaine de myéline est la plus petite dans les dCST dans les différents niveaux thoraciques, et elle est la plus élevée dans les tracts RST, ReST et VST.

Nous pouvons aussi remarquer que ses valeurs, pour un tract donné à gauche et à droite, sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-17 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-16 : Épaisseur moyenne de la gaine de myéline le long des vertèbres thoraciques.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>	<b>T10</b>	<b>T11</b>	<b>T12</b>	<b>T13</b>
FCT g	0,80	0,66	0,69	0,72	0,77	0,79	0,88	0,77	0,72	0,75	0,72
FCT d	0,79	0,67	0,68	0,71	0,77	0,79	0,86	0,75	0,72	0,75	0,71
FGT g	0,77	0,65	0,63	0,69	0,75	0,76	0,90	0,74	0,71	0,78	0,74
FGT d	0,75	0,67	0,69	0,67	0,74	0,73	0,88	0,74	0,71	0,76	0,75
dCST g	0,60	0,53	0,56	0,56	0,59	0,63	0,65	0,58	0,57	0,67	0,59
dCST d	0,60	0,53	0,56	0,57	0,60	0,65	0,67	0,59	0,58	0,63	0,60
RST g	0,65	0,72	0,75	0,73	0,78	0,76	0,92	0,84	0,79	0,75	0,69
RST d	0,72	0,73	0,74	0,72	0,79	0,78	0,81	0,79	0,75	0,76	0,74
ReST g	0,73	0,70	0,73	0,73	0,76	0,80	0,82	0,81	0,75	0,79	0,68
ReST d	0,76	0,75	0,71	0,72	0,78	0,80	0,80	0,80	0,74	0,77	0,72
VST g	0,82	0,79	0,78	0,84	0,90	0,87	0,95	0,90	0,90	0,90	0,80
VST d	0,82	0,80	0,76	0,82	0,92	0,84	0,99	0,87	0,87	0,89	0,84

Tableau 4-17 : Écart type de l'épaisseur moyenne de la gaine de myéline le long des niveaux thoraciques.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>	<b>T10</b>	<b>T11</b>	<b>T12</b>	<b>T13</b>
FCT g	0,04	0,04	0,69	0,72	0,77	0,79	0,88	0,77	0,04	0,04	0,05
FCT d	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,07	0,05	0,05	0,04	0,06
FGT g	0,04	0,04	0,04	0,06	0,05	0,04	0,10	0,04	0,04	0,07	0,05
FGT d	0,03	0,04	0,09	0,05	0,04	0,03	0,06	0,03	0,05	0,05	0,04
dCST g	0,07	0,03	0,04	0,03	0,03	0,04	0,06	0,03	0,04	0,05	0,07
dCST d	0,07	0,03	0,05	0,04	0,05	0,03	0,07	0,05	0,04	0,04	0,07
RST g	0,09	0,11	0,06	0,04	0,06	0,03	0,06	0,04	0,08	0,07	0,07
RST d	0,09	0,14	0,05	0,06	0,10	0,07	0,10	0,08	0,06	0,07	0,08
ReST g	0,06	0,04	0,05	0,05	0,10	0,06	0,12	0,06	0,04	0,04	0,03
ReST d	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05
VST g	0,04	0,05	0,04	0,04	0,05	0,04	0,08	0,05	0,06	0,05	0,08
VST d	0,04	0,05	0,09	0,07	0,07	0,05	0,07	0,04	0,06	0,05	0,07

De même, dans le Tableau 4-18 nous observons que l'épaisseur de la gaine de myéline est la plus petite dans les dCST dans les différents niveaux lombaires, et elle est la plus élevée dans les tracts RST, ReST et VST.

Nous pouvons aussi remarquer que ses valeurs, pour un tract donné à gauche et à droite, sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-18 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-18 : Épaisseur moyenne de la gaine de myéline (à gauche) et écart type de l'épaisseur de la gaine de myéline (à droite) le long des niveaux lombaires.

	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>		<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>
FCT g	0,71	0,66	0,72	FCT g	0,07	0,09	0,04
FCT d	0,69	0,67	0,74	FCT d	0,06	0,07	0,06
FGT g	0,78	0,69	0,74	FGT g	0,06	0,06	0,04
FGT d	0,75	0,69	0,76	FGT d	0,03	0,06	0,05
dCST g	0,58	0,60	0,61	dCST g	0,08	0,06	0,04
dCST d	0,60	0,56	0,63	dCST d	0,09	0,03	0,04
RST g	0,64	0,63	0,68	RST g	0,06	0,09	0,05
RST d	0,64	0,62	0,68	RST d	0,05	0,08	0,04
ReST g	0,68	0,65	0,74	ReST g	0,03	0,02	0,02
ReST d	0,66	0,68	0,75	ReST d	0,02	0,03	0,02
VST g	0,79	0,75	0,78	VST g	0,04	0,06	0,05
VST d	0,75	0,77	0,79	VST d	0,04	0,08	0,06

De même, dans le Tableau 4-19 nous observons que l'épaisseur de la gaine de myéline est la plus petite dans les dCST dans les différents niveaux sacraux, et elle est la plus élevée dans les tracts RST, ReST et VST.

Nous pouvons aussi remarquer que ses valeurs, pour un tract donné à gauche et à droite, sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-19 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-19 : Épaisseur moyenne de la gaine de myéline (à gauche) et écart type de l'épaisseur moyenne de la gaine de myéline (à droite) le long des vertèbres sacrales.

	S1	S2		S1	S2
FCT g	0,63	0,78	FCT g	0,06	0,08
FCT d	0,63	0,74	FCT d	0,07	0,07
FGT g	0,67	0,73	FGT g	0,05	0,06
FGT d	0,67	0,71	FGT d	0,07	0,06
dCST g	0,54	0,61	dCST g	0,02	0,01
dCST d	0,52	0,63	dCST d	0,02	0,02
RST g	0,59	0,66	RST g	0,03	0,04
RST d	0,62	0,66	RST d	0,05	0,06
ReST g	0,67	0,74	ReST g	0,03	0,03
ReST d	0,65	0,73	ReST d	0,03	0,03
VST g	0,76	0,78	VST g	0,09	0,06
VST d	0,68	0,77	VST d	0,09	0,06

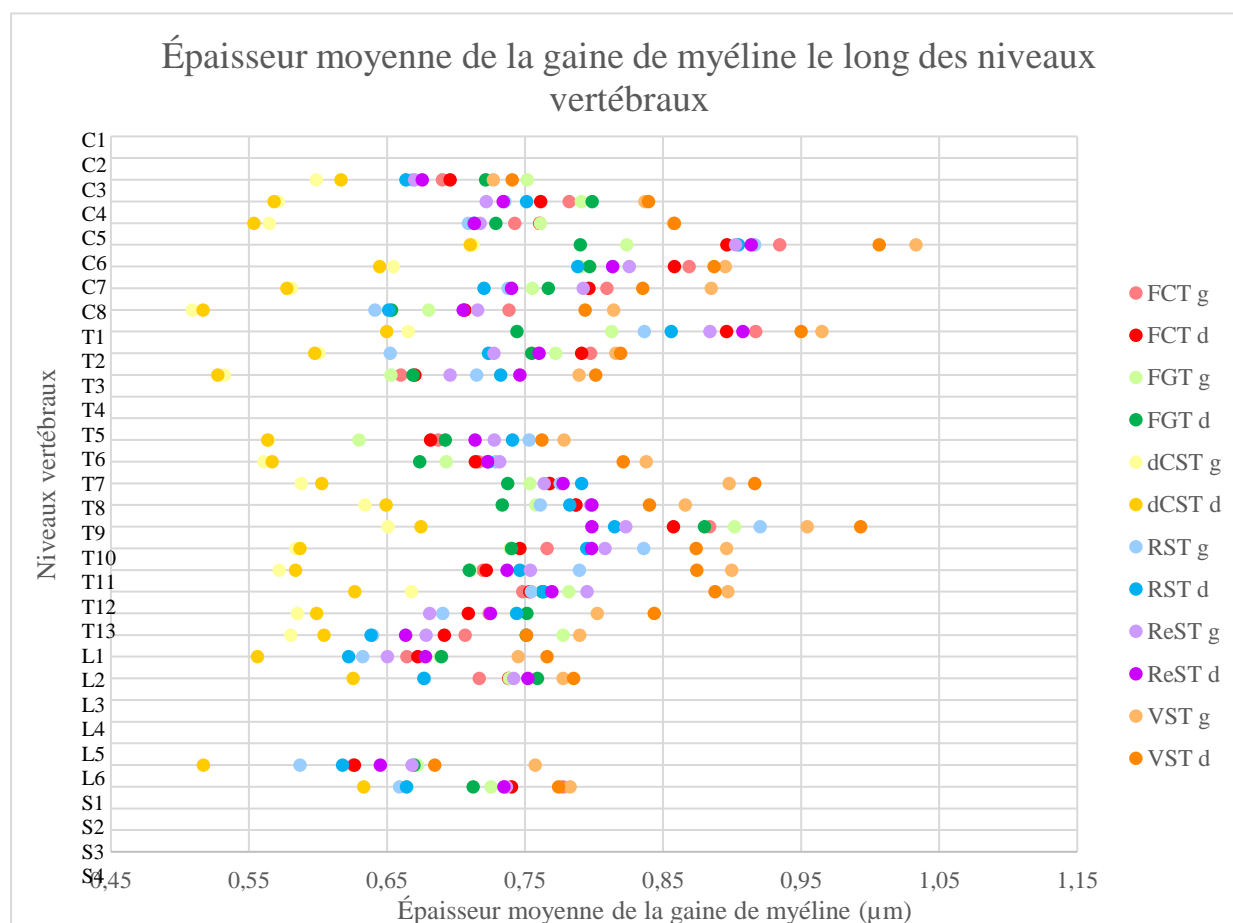


Figure 4-10 : Épaisseur de la gaine de myéline des cartes moyennées le long des niveaux vertébraux entre les rats avec g pour gauche et d pour droite.

#### 4.5.4 G-ratio

Dans le Tableau 4-20 nous observons que le g-ratio reste constant au sein de la matière blanche et, est le même dans tous les tracts quel que soit le niveau cervical.

Nous pouvons aussi remarquer que ses valeurs, pour un tract donné à gauche et à droite, sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-21 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-20 : G-ratio moyen le long des vertèbres cervicales.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
FCT g	0,56	0,56	0,57	0,55	0,55	0,57	0,59	0,56
FCT d	0,56	0,57	0,57	0,55	0,55	0,57	0,58	0,54
FGT g	0,56	0,56	0,57	0,54	0,53	0,56	0,58	0,54
FGT d	0,56	0,55	0,56	0,54	0,53	0,56	0,58	0,53
dCST g	0,55	0,55	0,55	0,54	0,55	0,55	0,57	0,54
dCST d	0,55	0,55	0,55	0,54	0,55	0,55	0,56	0,54
RST g	0,55	0,56	0,57	0,55	0,54	0,56	0,58	0,54
RST d	0,54	0,55	0,56	0,54	0,51	0,56	0,58	0,54
ReST g	0,56	0,56	0,57	0,55	0,56	0,57	0,58	0,54
ReST d	0,56	0,56	0,57	0,55	0,55	0,57	0,58	0,54
VST g	0,57	0,57	0,58	0,56	0,53	0,58	0,58	0,53
VST d	0,57	0,57	0,58	0,56	0,54	0,57	0,58	0,53

Tableau 4-21 : Écart type du g-ratio moyen le long des vertèbres cervicales.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
FCT g	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01
FCT d	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02	0,05
FGT g	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	0,01	0,00	0,01
FGT d	0,01	0,02	0,01	0,00	0,04	0,01	0,01	0,00
dCST g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
dCST d	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01
RST g	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01
RST d	0,01	0,02	0,01	0,04	0,07	0,02	0,01	0,02
ReST g	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
ReST d	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
VST g	0,01	0,01	0,01	0,01	0,06	0,02	0,02	0,06
VST d	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,02	0,02	0,05

Dans le Tableau 4-22 nous observons que le g-ratio reste constant au sein de la matière blanche et, est le même dans tous les tracts quel que soit le niveau thoracique.

Nous pouvons aussi remarquer que ses valeurs, pour un tract donné à gauche et à droite, sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-23 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-22 : G-ratio moyen le long des vertèbres thoraciques.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>	<b>T10</b>	<b>T11</b>	<b>T12</b>	<b>T13</b>
FCT g	0,57	0,56	0,56	0,58	0,56	0,56	0,57	0,57	0,56	0,56	0,57
FCT d	0,57	0,56	0,56	0,58	0,56	0,57	0,57	0,56	0,56	0,56	0,56
FGT g	0,56	0,55	0,53	0,58	0,55	0,56	0,57	0,55	0,56	0,55	0,56
FGT d	0,56	0,55	0,56	0,58	0,55	0,55	0,57	0,55	0,56	0,55	0,57
dCST g	0,55	0,54	0,55	0,57	0,55	0,56	0,55	0,55	0,55	0,54	0,55
dCST d	0,55	0,54	0,56	0,57	0,55	0,56	0,56	0,55	0,55	0,54	0,55
RST g	0,56	0,56	0,56	0,57	0,55	0,55	0,56	0,56	0,56	0,55	0,55
RST d	0,56	0,56	0,56	0,58	0,56	0,55	0,54	0,55	0,56	0,55	0,56
ReST g	0,56	0,55	0,55	0,58	0,56	0,56	0,55	0,56	0,56	0,56	0,56
ReST d	0,56	0,56	0,55	0,58	0,56	0,56	0,54	0,56	0,56	0,56	0,56
VST g	0,57	0,56	0,54	0,58	0,57	0,55	0,57	0,57	0,57	0,56	0,56
VST d	0,57	0,56	0,55	0,58	0,57	0,53	0,57	0,56	0,57	0,55	0,56

Tableau 4-23 : Écart type du g-ratio moyen le long des vertèbres thoraciques.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>	<b>T10</b>	<b>T11</b>	<b>T12</b>	<b>T13</b>
FCT g	0,01	0,01	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,56	0,56	0,57
FCT d	0,01	0,01	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,57	0,57	0,57
FGT g	0,01	0,01	0,08	0,00	0,01	0,02	0,00	0,02	0,56	0,57	0,58
FGT d	0,01	0,01	0,02	0,00	0,01	0,03	0,00	0,02	0,57	0,57	0,58
dCST g	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,56	0,54	0,56
dCST d	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,56	0,55	0,55
RST g	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,56	0,55	0,56
RST d	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,55	0,55	0,55
ReST g	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,57	0,57	0,57
ReST d	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,57	0,57	0,57
VST g	0,01	0,01	0,06	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,57	0,57	0,58
VST d	0,01	0,03	0,06	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02	0,57	0,56	0,58

Dans le Tableau 4-24 et le Tableau 4-25 nous observons que le g-ratio reste constant au sein de la matière blanche et, est le même dans tous les tracts quel que soit le niveau lombaire et sacral.

Nous pouvons aussi remarquer que ses valeurs, pour un tract donné à gauche et à droite, sont presque similaires. Nous étudierons plus bas la latéralité des métriques dans les différents tracts. Aussi, dans le Tableau 4-25 nous pouvons remarquer que les écarts type sont assez faibles.

Tableau 4-24 : G-ratio moyen (à gauche) et écart type du g-ratio moyen (à droite) le long des vertèbres lombaires.

	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>13</b>		<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>13</b>
FCT g	0,56	0,56	0,57	FCT g	0,01	0,04	0,01
FCT d	0,57	0,57	0,57	FCT d	0,01	0,02	0,01
FGT g	0,56	0,57	0,58	FGT g	0,01	0,01	0,01
FGT d	0,57	0,57	0,58	FGT d	0,01	0,01	0,01
dCST g	0,56	0,54	0,56	dCST g	0,01	0,01	0,00
dCST d	0,56	0,55	0,55	dCST d	0,01	0,00	0,00
RST g	0,56	0,55	0,56	RST g	0,01	0,07	0,01
RST d	0,55	0,55	0,55	RST d	0,02	0,07	0,03
ReST g	0,57	0,57	0,57	ReST g	0,01	0,01	0,00
ReST d	0,57	0,57	0,57	ReST d	0,01	0,01	0,00
VST g	0,57	0,57	0,58	VST g	0,01	0,03	0,01
VST d	0,57	0,56	0,58	VST d	0,01	0,05	0,01

Tableau 4-25 : G-ratio moyen (à gauche) et écart type du g-ratio moyen (à droite) le long des vertèbres sacrales.

	<b>S1</b>	<b>S2</b>		<b>S1</b>	<b>S2</b>
FCT g	0,56	0,57	FCT g	0,03	0,03
FCT d	0,55	0,55	FCT d	0,03	0,03
FGT g	0,57	0,56	FGT g	0,01	0,02
FGT d	0,56	0,55	FGT d	0,04	0,03
dCST g	0,55	0,55	dCST g	0,01	0,00
dCST d	0,55	0,55	dCST d	0,01	0,00
RST g	0,54	0,55	RST g	0,01	0,01
RST d	0,54	0,55	RST d	0,04	0,01
ReST g	0,56	0,57	ReST g	0,00	0,00
ReST d	0,56	0,57	ReST d	0,00	0,01
VST g	0,57	0,55	VST g	0,02	0,04
VST d	0,55	0,56	VST d	0,06	0,04

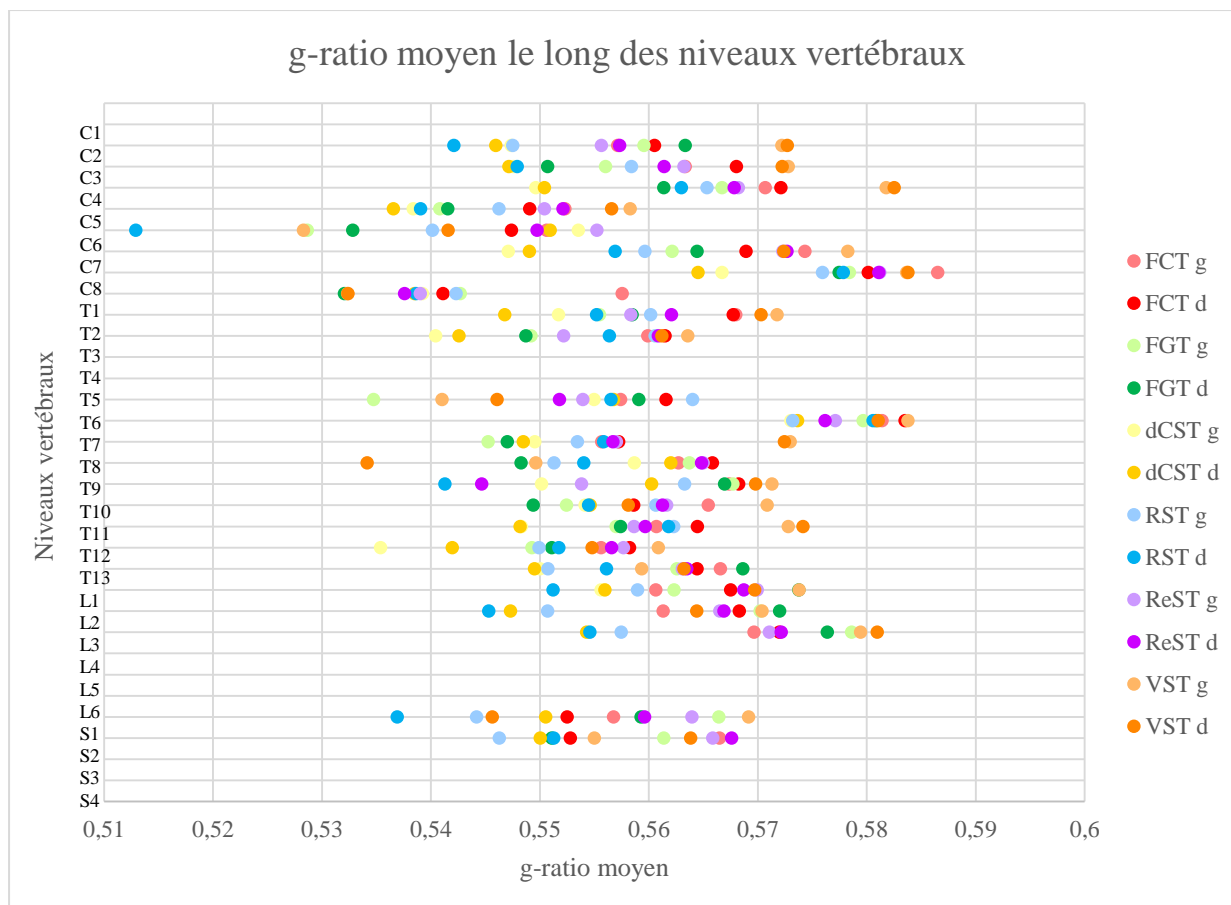


Figure 4-11 : G-ratio des cartes moyennées le long des niveaux vertébraux entre les rats avec g pour gauche et d pour droite.

## 4.6 Étude de la variabilité le long des niveaux vertébraux

### 4.6.1 Étude de la variabilité entre les niveaux C, T, L et S moyennés

Nous pouvons observer sur la Figure 4-12 que le diamètre axonal a tendance à diminuer le long des niveaux vertébraux, du cervical vers le sacral.



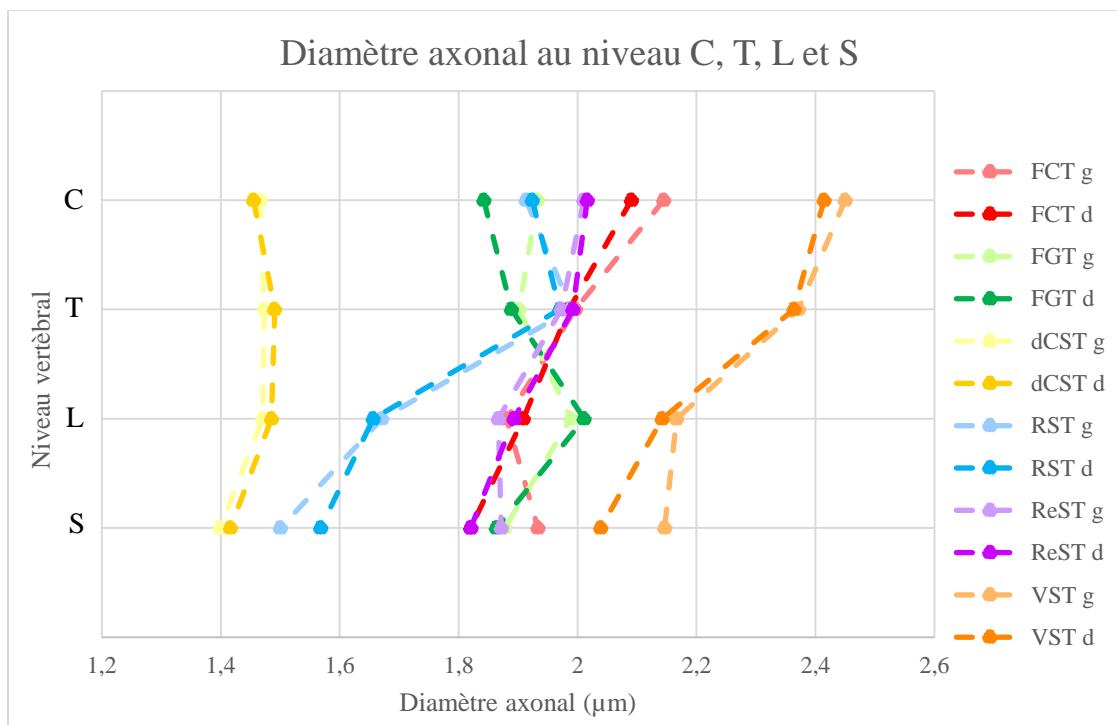


Figure 4-12 : Diamètre axonal aux niveaux C (N=3), T (N=4), L (N=3) et S (N=2) moyennés.

Nous remarquons également que la densité axonale a tendance à diminuer du cervical vers le sacré (Figure 4-13).

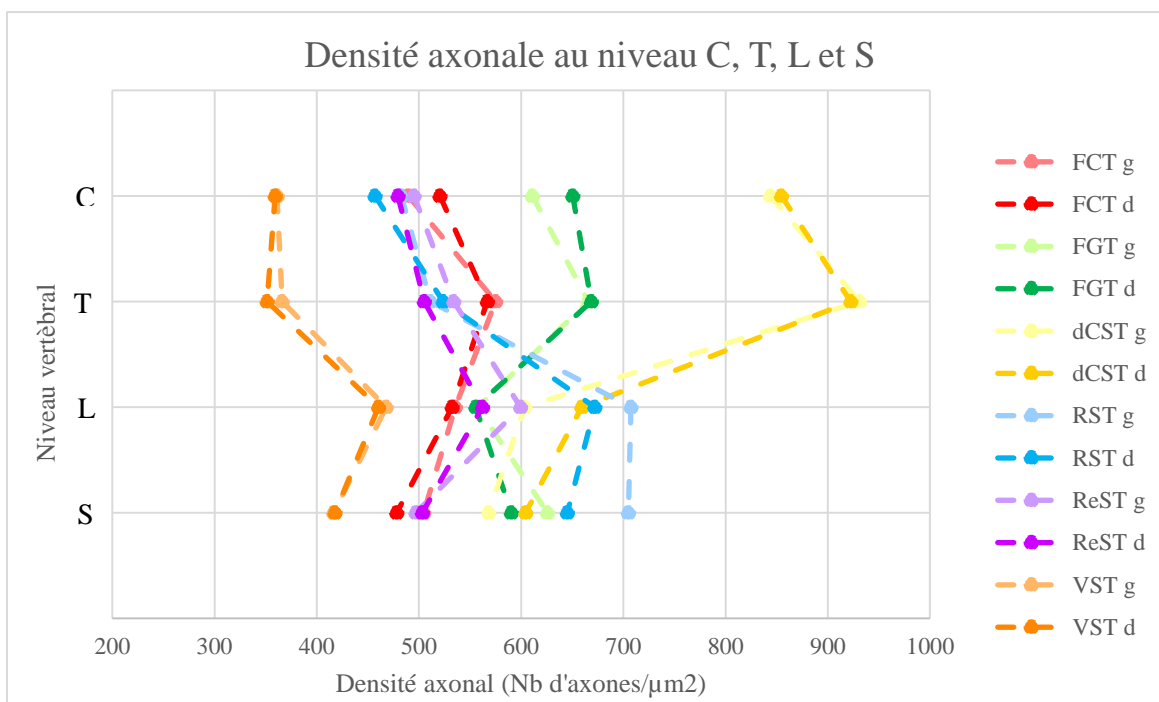


Figure 4-13 : Densité axonale aux niveaux C (N=3), T (N=4), L (N=3) et S (N=2) moyennés.

En ce qui concerne l'épaisseur de la gaine de myéline, nous remarquons qu'elle diminue du cervical vers le sacral (Figure 4-14).

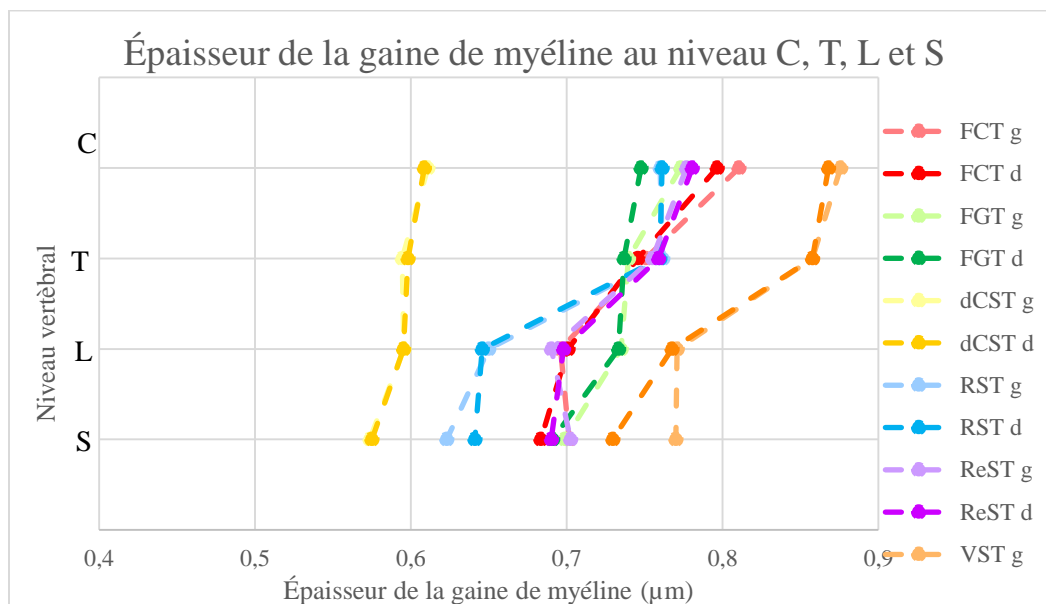


Figure 4-14 : Épaisseur de la gaine de myéline aux niveaux C (N=3), T (N=4), L (N=3) et S (N=2) moyennés.

En ce qui concerne le g-ratio, bien que les valeurs restent très proches entre les différents niveaux, nous pouvons observer que le g-ratio augmente du cervical vers le lombaire mais qu'il diminue du lombaire vers le sacral.

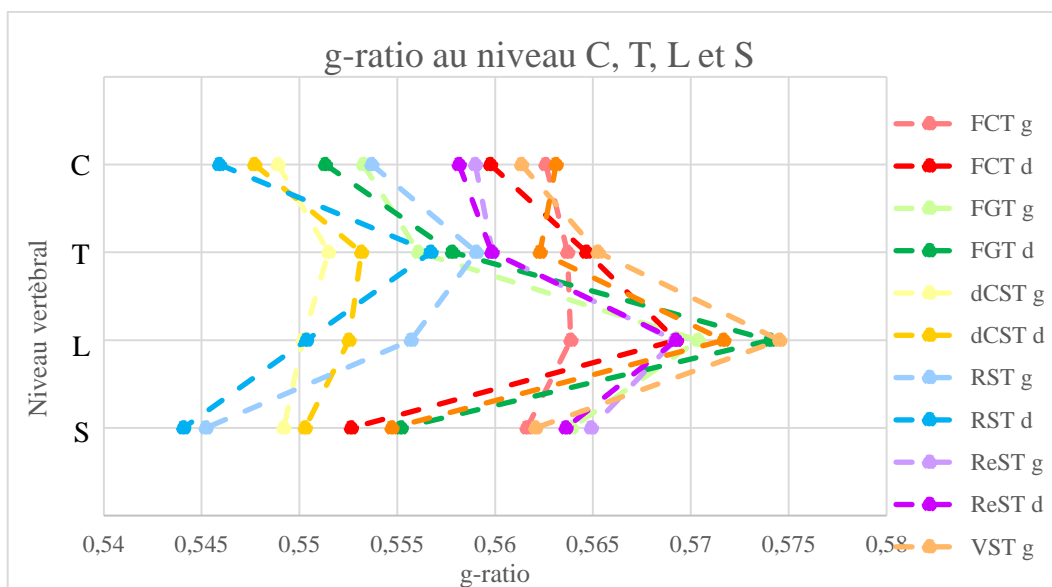


Figure 4-15 : G-ratio aux niveaux C (N=3), T (N=4), L (N=3) et S (N=2) moyennés.

## 4.6.2 Étude de la variabilité gauche/droite

Avec les résultats mentionnés ci-dessus, nous avons pu observer une symétrie des métriques de part et d'autre de la matière blanche pour tous les tracts. Pour observer cette symétrie, nous avons tracé les métriques obtenues dans les tracts de la moitié gauche de la matière blanche en fonction des métriques obtenus dans les tracts de la moitié droite de la matière blanche.

En Annexe A nous trouverons d'autres études de symétrie, i.e. le diamètre axonal en fonction du g-ratio, de l'épaisseur de la gaine de myéline, de la densité axonale et du g-ratio en fonction de la densité axonale.

### 4.6.2.1 Diamètre axonal

Nous pouvons observer sur la Figure 4-16 qu'il existe une symétrie des tracts gauche et droite pour les niveaux cervicaux.

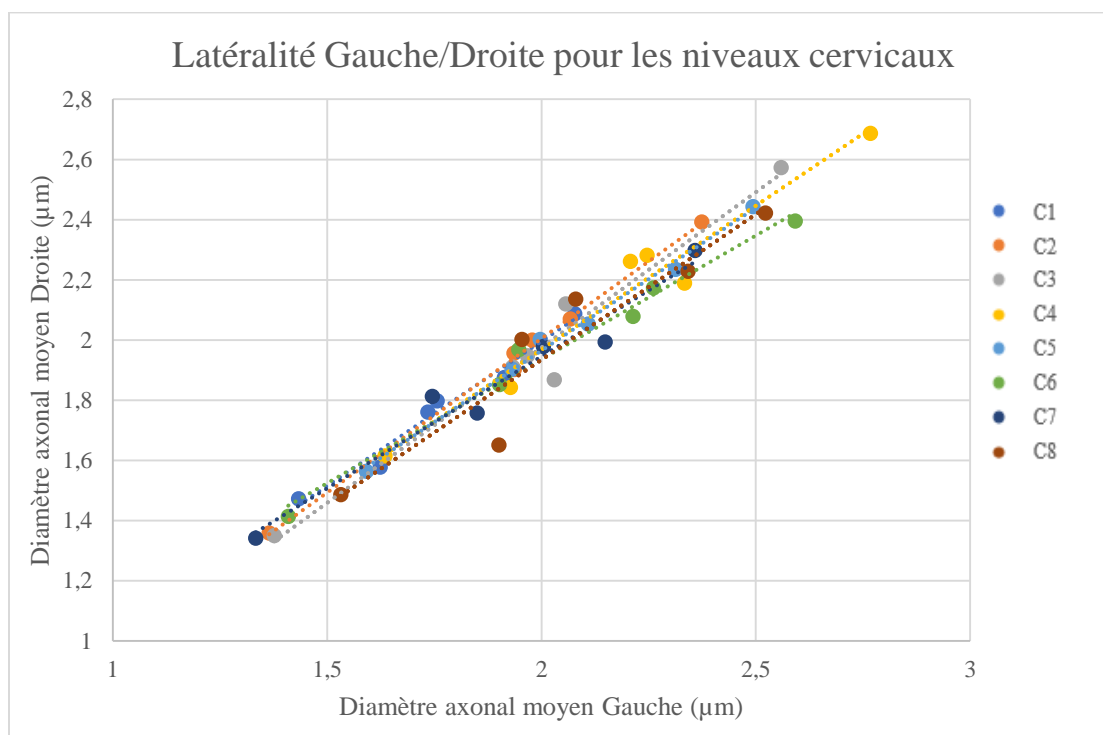


Figure 4-16 : Latéralité Gauche/Droite pour le diamètre axonal le long des vertèbres cervicales.

Nous faisons la même observation pour les niveaux thoraciques (Figure 4-17), lombaires (Figure 4-118) et sacraux (Figure 4-19).

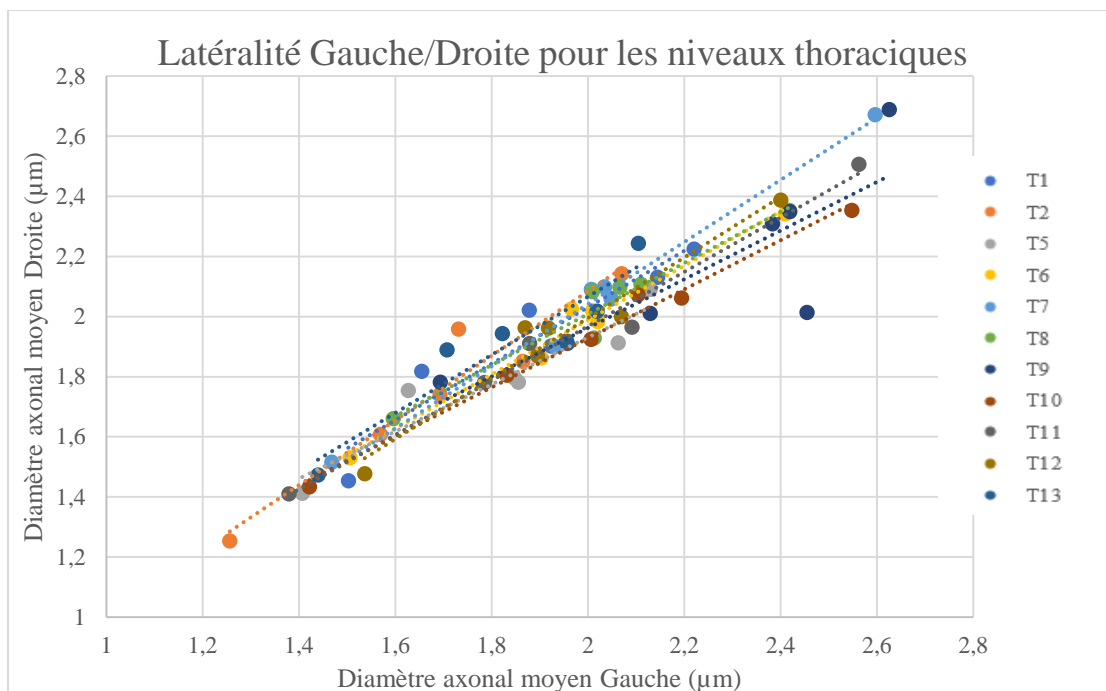


Figure 4-17 : Latéralité Gauche/Droite pour le diamètre axonal le long des vertèbres thoraciques.

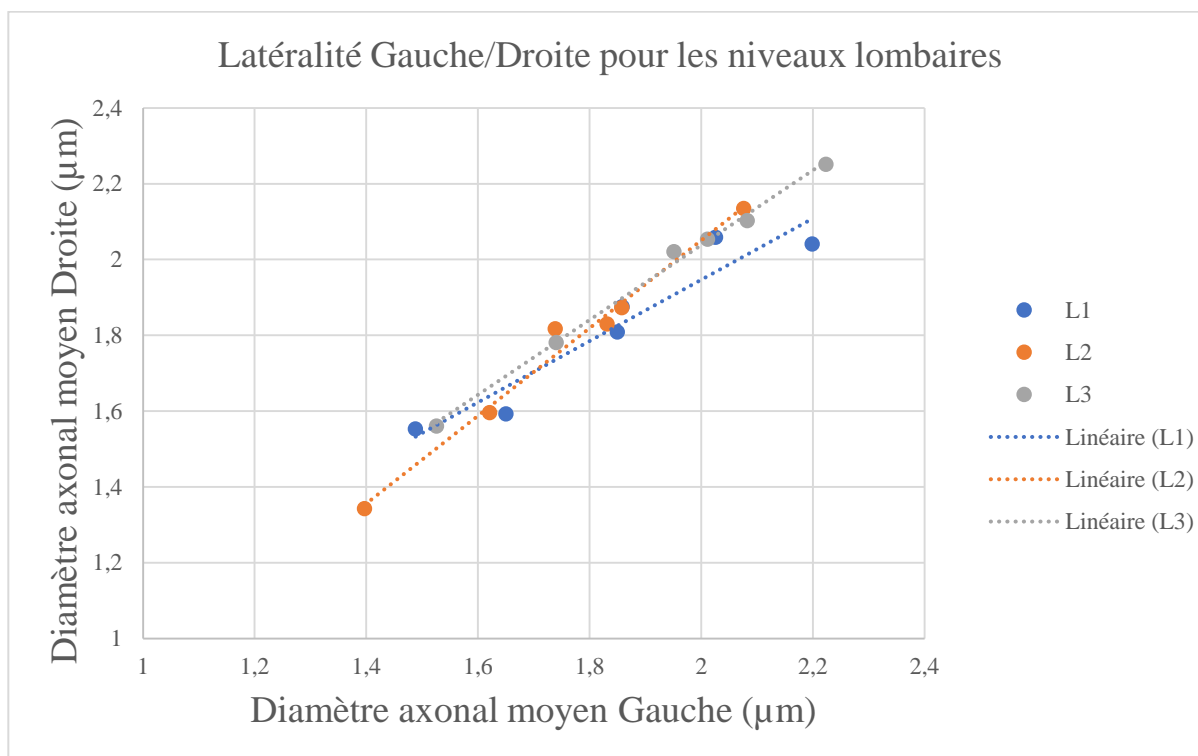


Figure 4-18 : Latéralité Gauche/Droite pour le diamètre axonal le long des vertèbres lombaires.

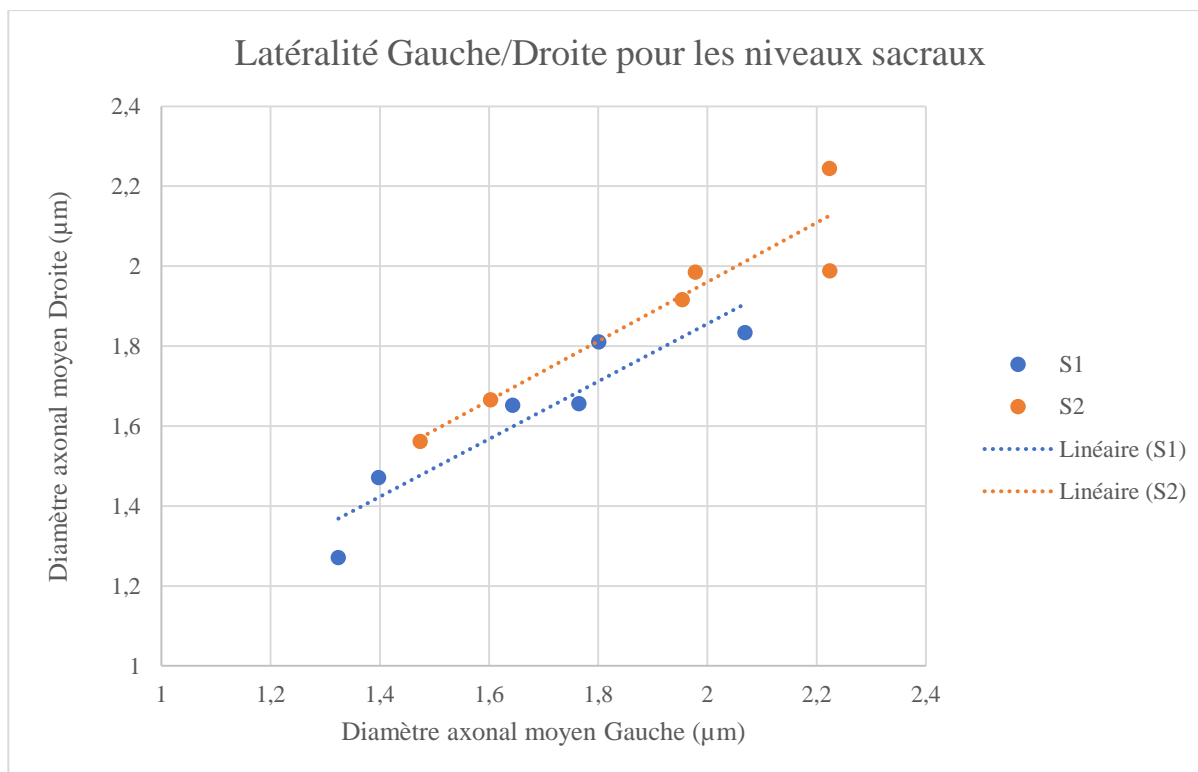


Figure 4-19 : Latéralité Gauche/Droite pour le diamètre axonal le long des vertèbres sacrales.

#### 4.6.2.2 Densité axonale

Nous observons également une symétrie des tracts gauche et droite pour la densité axonale le long des niveaux vertébraux.

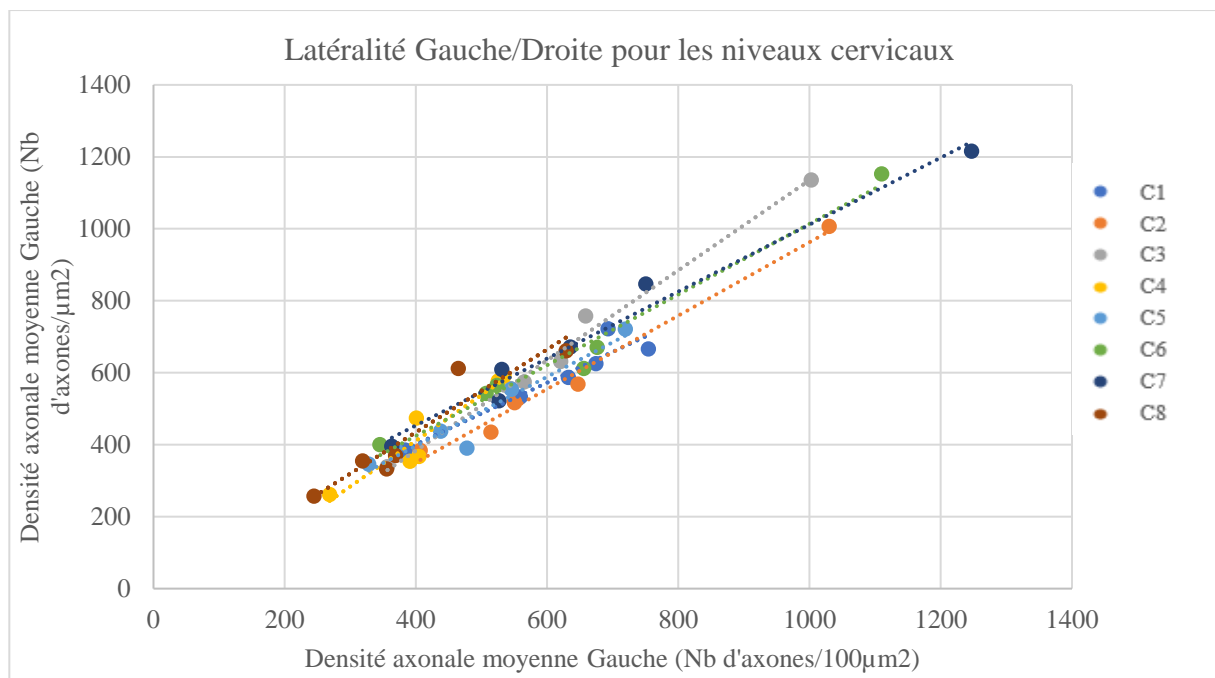


Figure 4-20 : Latéralité Gauche-Droite pour la densité axonale le long des vertèbres cervicales.

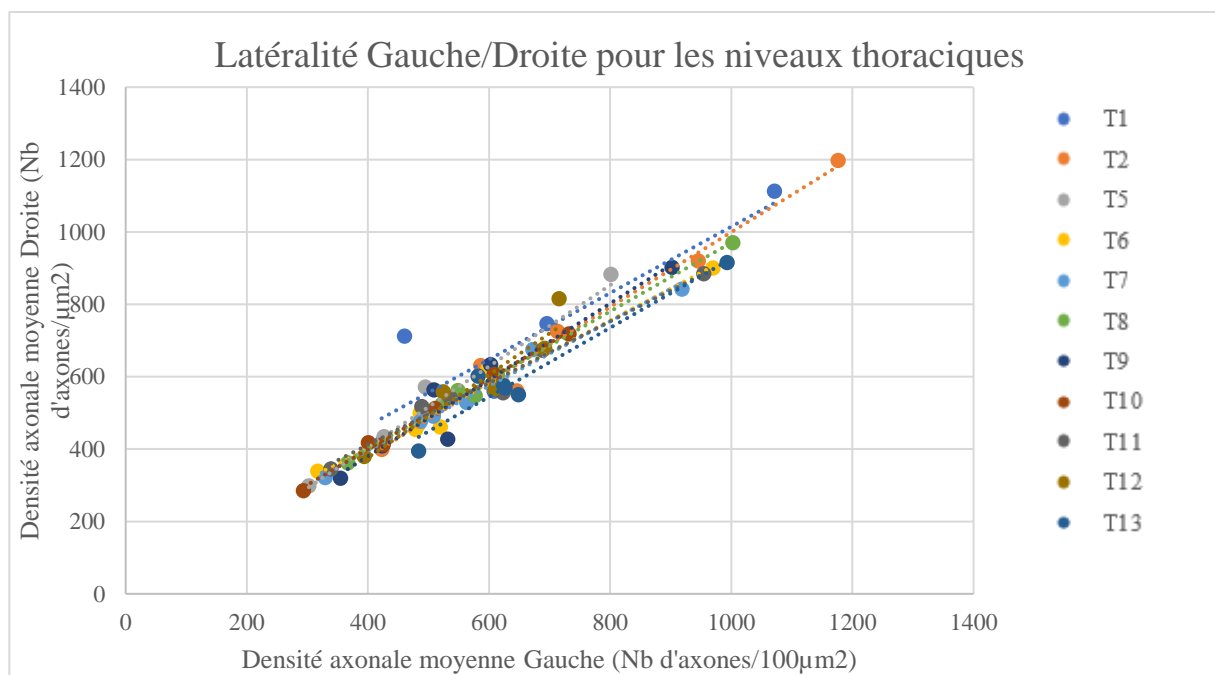


Figure 4-21 : Latéralité Gauche-Droite pour la densité axonale le long des vertèbres thoraciques.

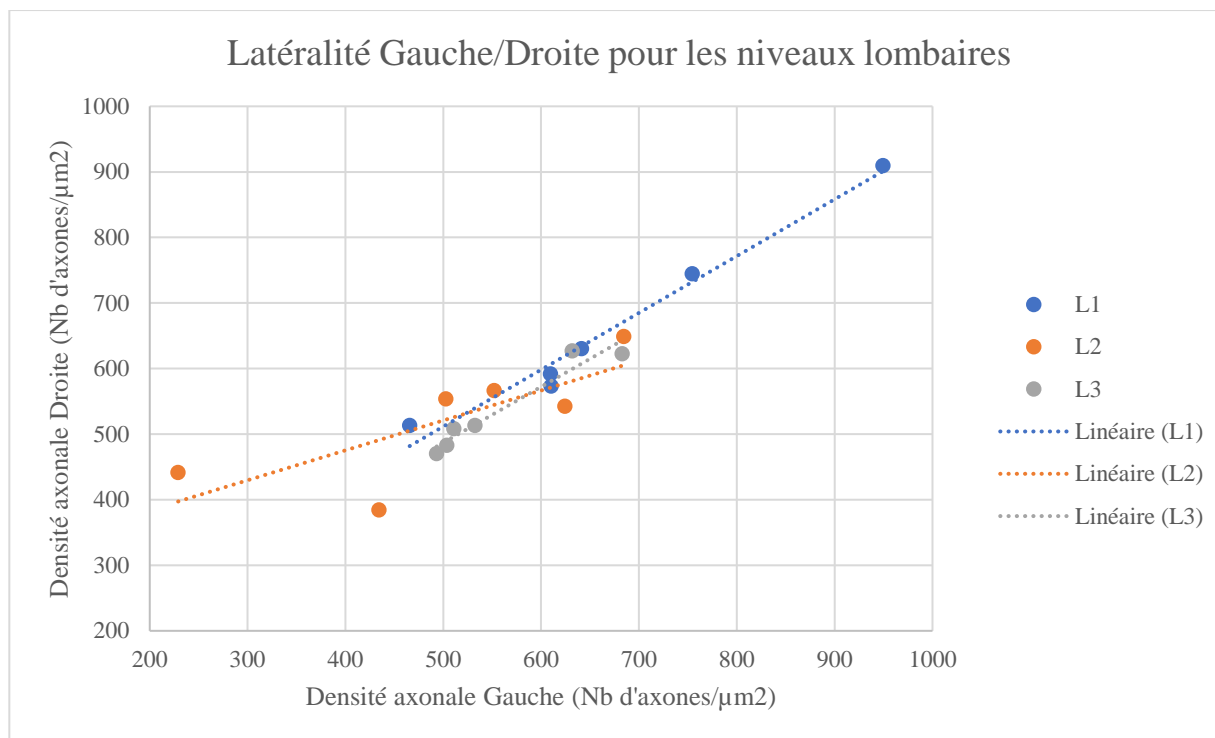


Figure 4-22 : Latéralité Gauche-Droite pour la densité axonale le long des vertèbres lombaires.

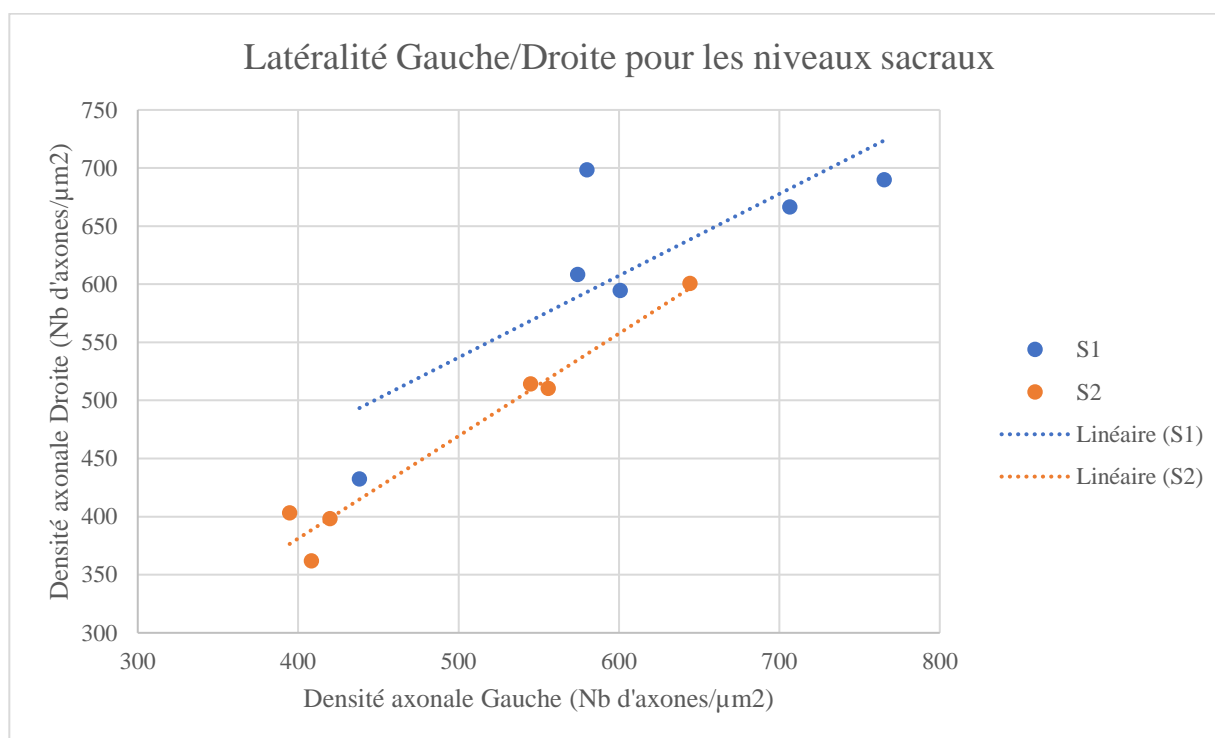


Figure 4-23 : Latéralité Gauche-Droite pour la densité axonale le long des vertèbres sacrales.

### 4.6.2.3 Épaisseur de la gaine de myéline

Nous observons également une symétrie des tracts gauche et droite pour l'épaisseur de la gaine de myéline le long des niveaux vertébraux.

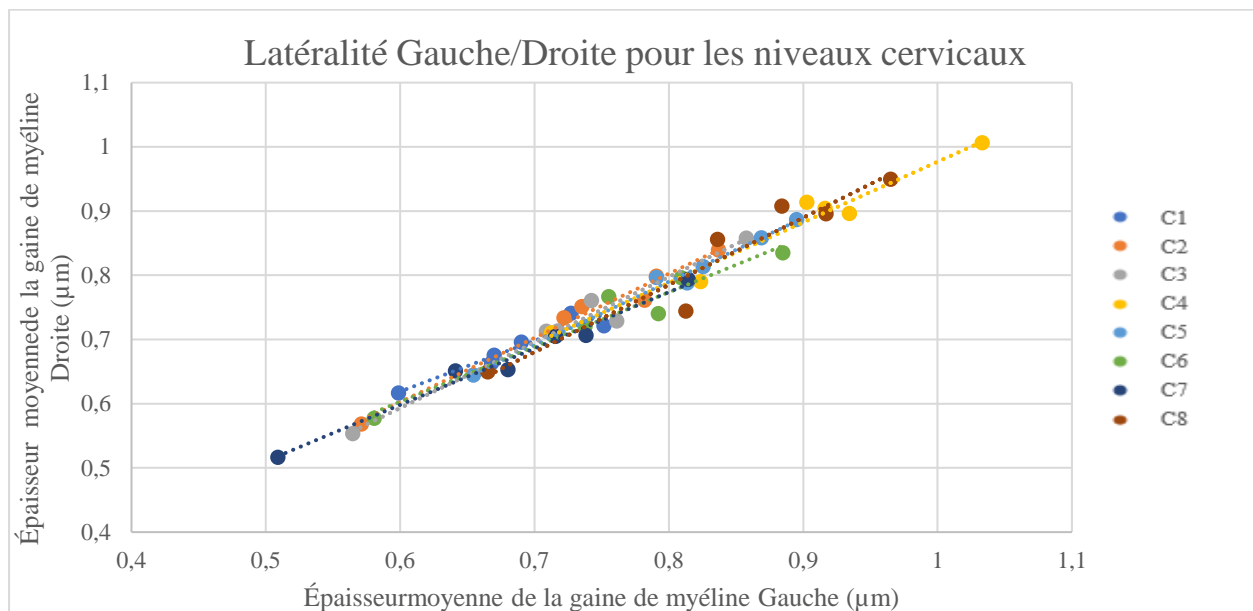


Figure 4-24 : Latéralité Gauche/Droite de l'épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres cervicales.

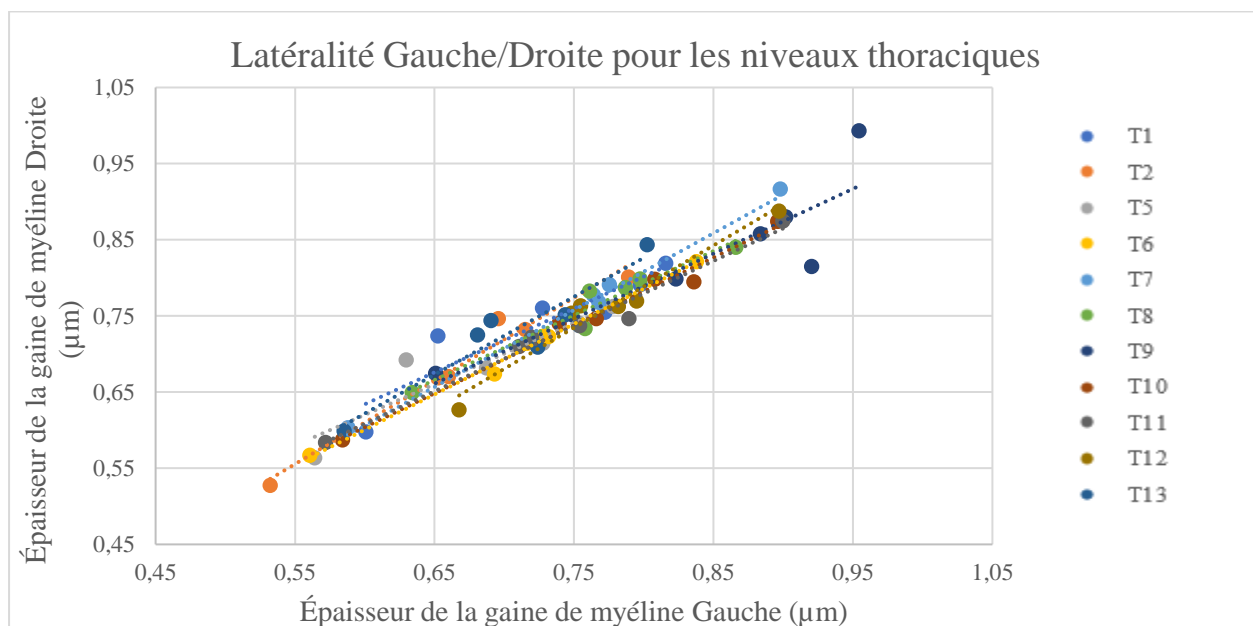


Figure 4-25 : Latéralité Gauche/Droite pour l'épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres thoraciques.



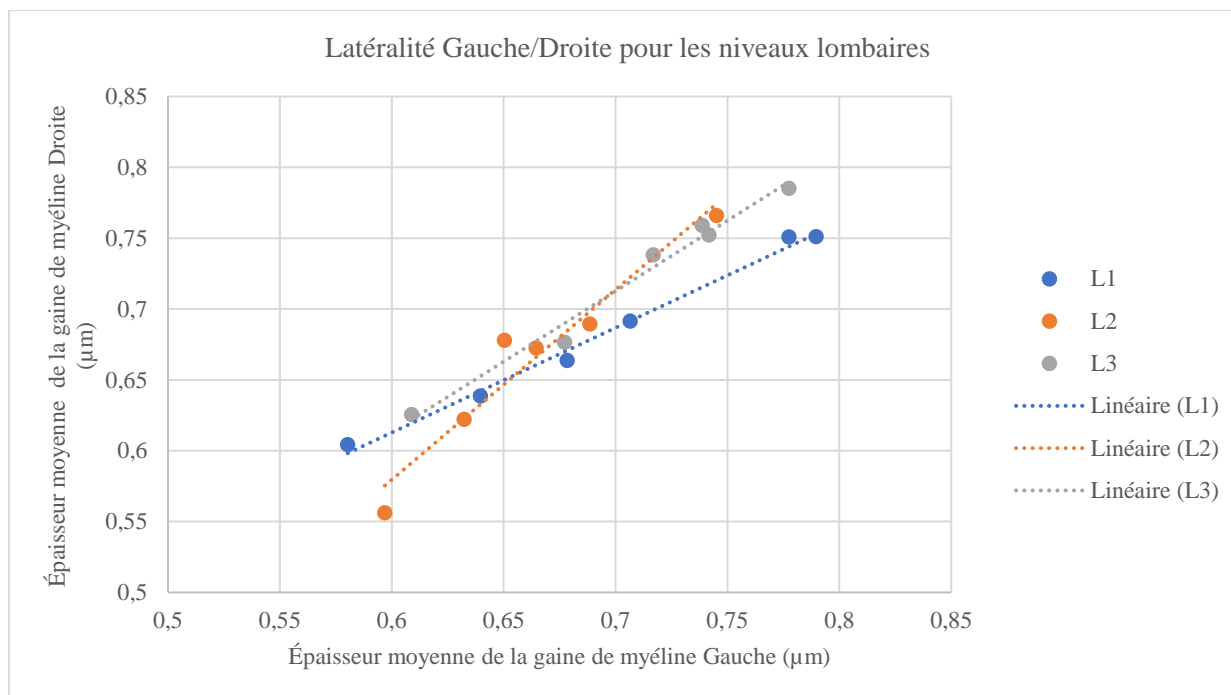


Figure 4-26 : Latéralité Gauche/Droite pour l'épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres lombaires.

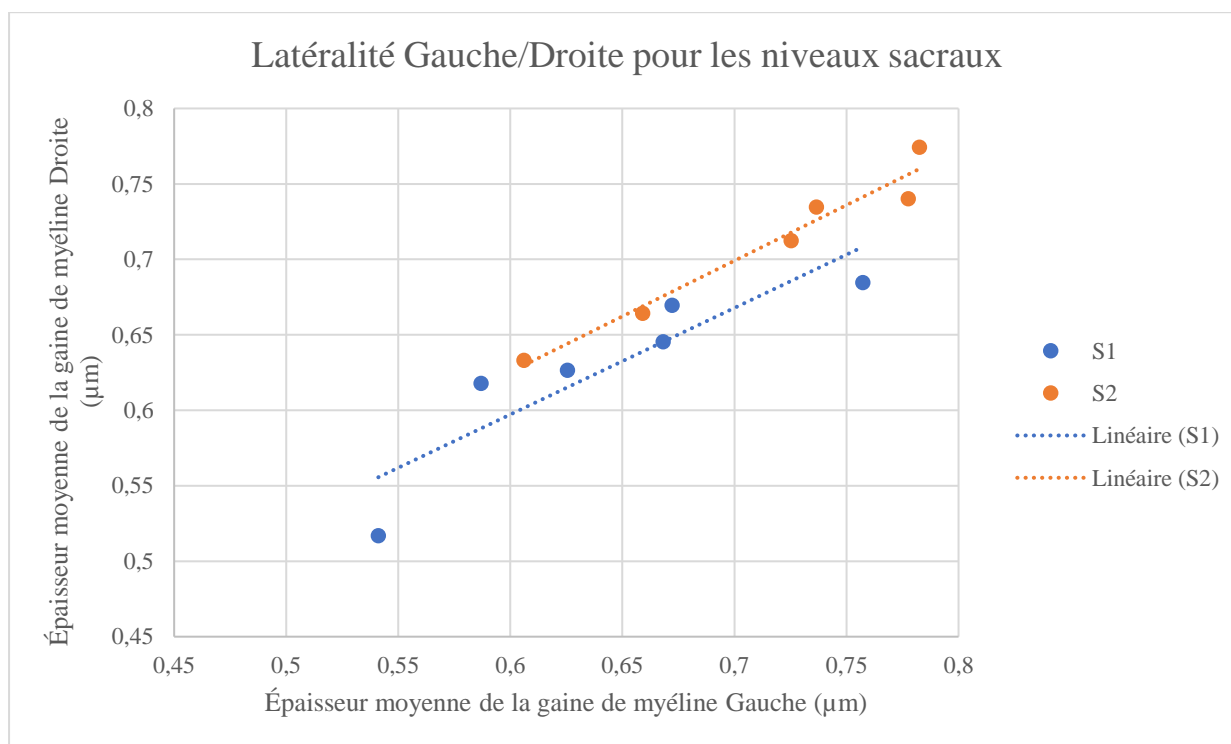


Figure 4-27 : Latéralité Gauche/Droite pour l'épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres sacraux.

#### 4.6.2.4 G-ratio

En ce qui concerne le g-ratio, nous observons une symétrie des tracts gauche et droite pour les niveaux cervicaux (Figure 4-28) et thoraciques (Figure 4-29).

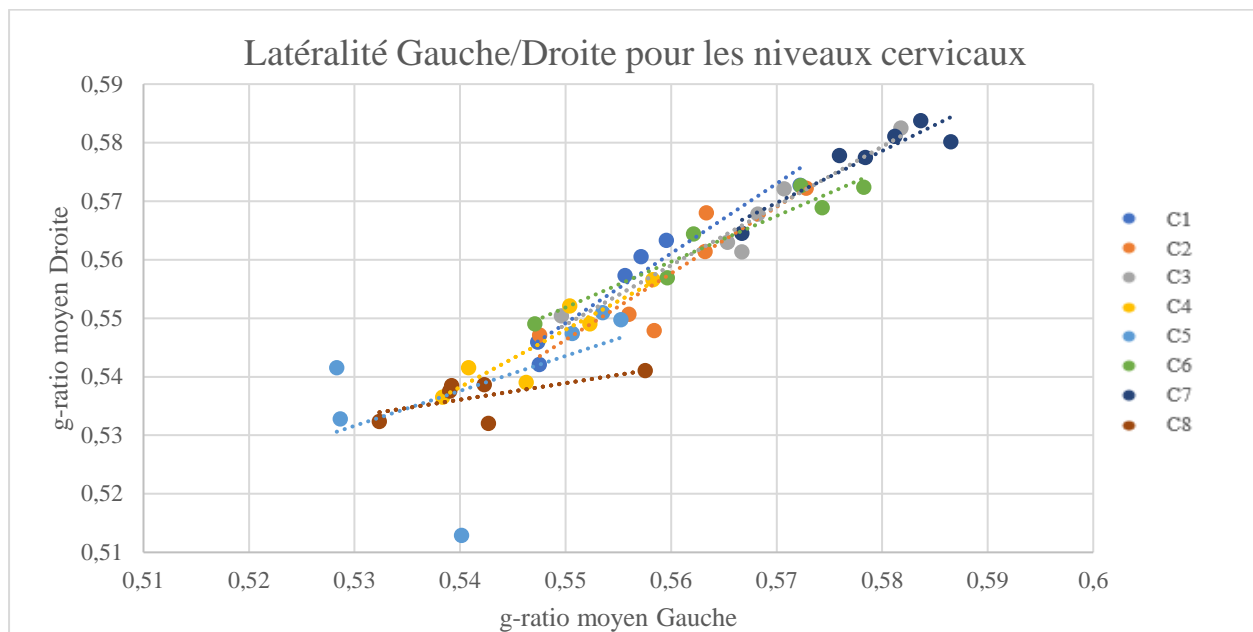


Figure 4-28 : Latéralité Gauche/Droite pour le g-ratio le long des vertèbres cervicales.

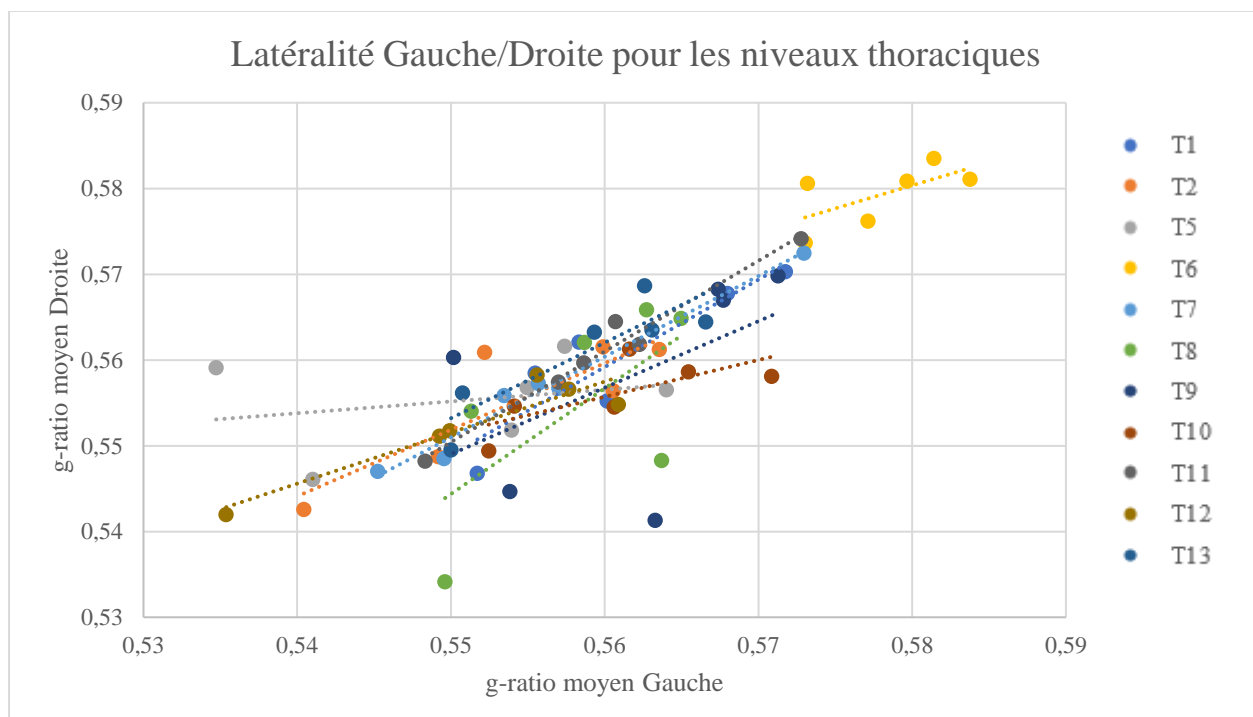


Figure 4-29 : Latéralité Gauche/Droite pour le g-ratio le long des vertèbres thoraciques.

En revanche, il est plus difficile d'observer cette tendance pour les niveaux lombaires (Figure 4-30) et sacraux (Figure 4-31).

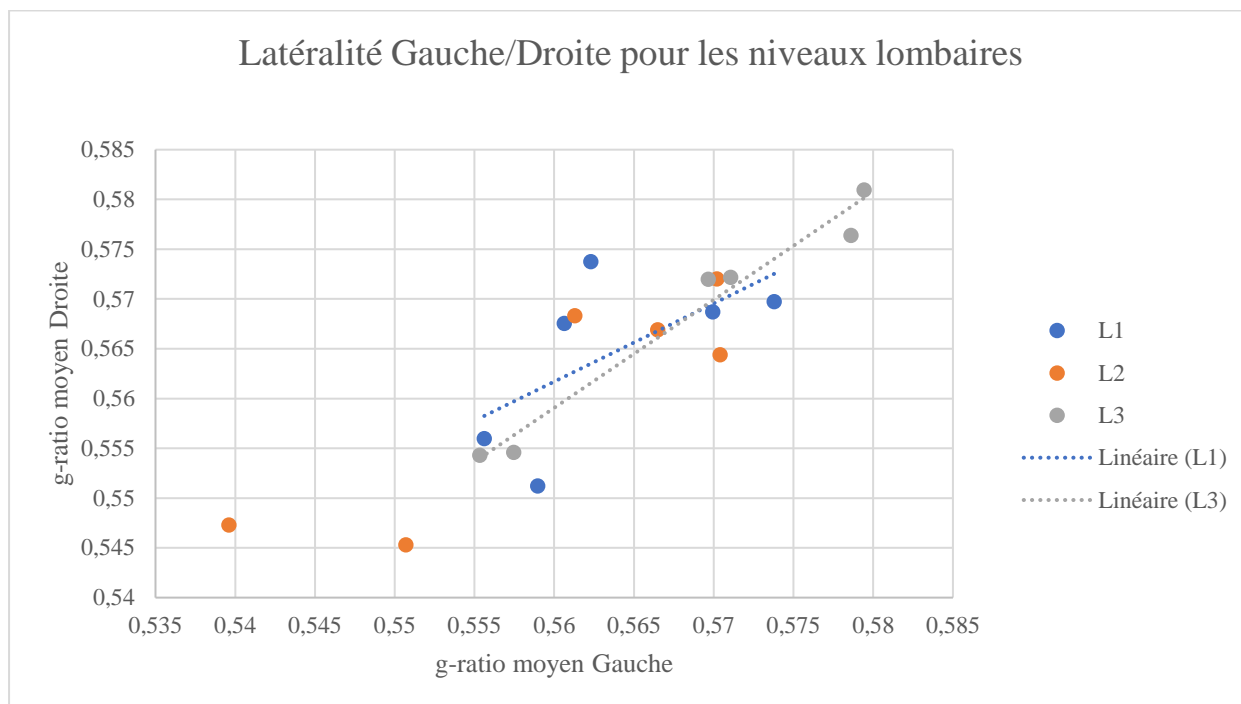


Figure 4-30 : Latéralité Gauche/Droite pour le g-ratio le long des vertèbres lombaires.

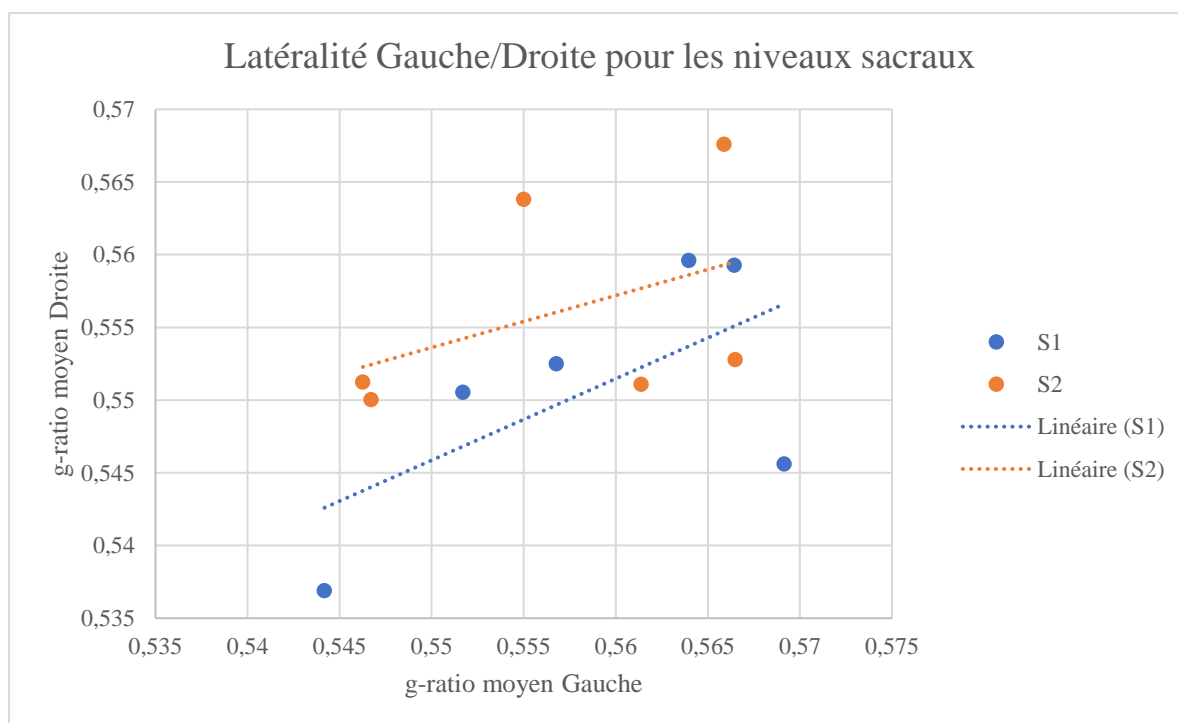


Figure 4-31 : Latéralité Gauche/Droite pour le g-ratio le long des vertèbres sacrales.

## CHAPITRE 5 DISCUSSION DES RÉSULTATS

Dans ce projet, nous avons mis au point une méthodologie pour préparer et observer les différents niveaux vertébraux de la moelle épinière chez le rat. Une fois ces coupes histologiques acquises, ces images ont été traitées pour en extraire des biomarqueurs microstructuraux le long de la moelle et entre différents rats.

Dans ce chapitre, nous discutons les résultats du Chapitre 4 et des limites de notre méthodologie dans la création de notre atlas microstructural de la matière blanche. Pour finir nous proposons les perspectives pour améliorer notre travail.

### 5.1 Préparation du tissu : Artéfacts de fixation

Après avoir essayé plusieurs protocoles, nous avons pu remarquer que nous obtenons une meilleure préservation de la microstructure de la matière blanche avec la technique de perfusion à 3% PFA et 3% Ga. Cependant nous faisons toujours face à des artéfacts de fixations (contraction et gonflement de la myéline) qui entraîne la perte de l'espace extracellulaire (Figure 5-1). Ces artéfacts de fixations peuvent induire un biais lors de la segmentation qui sur-estime le diamètre axonal et l'épaisseur de la myéline.

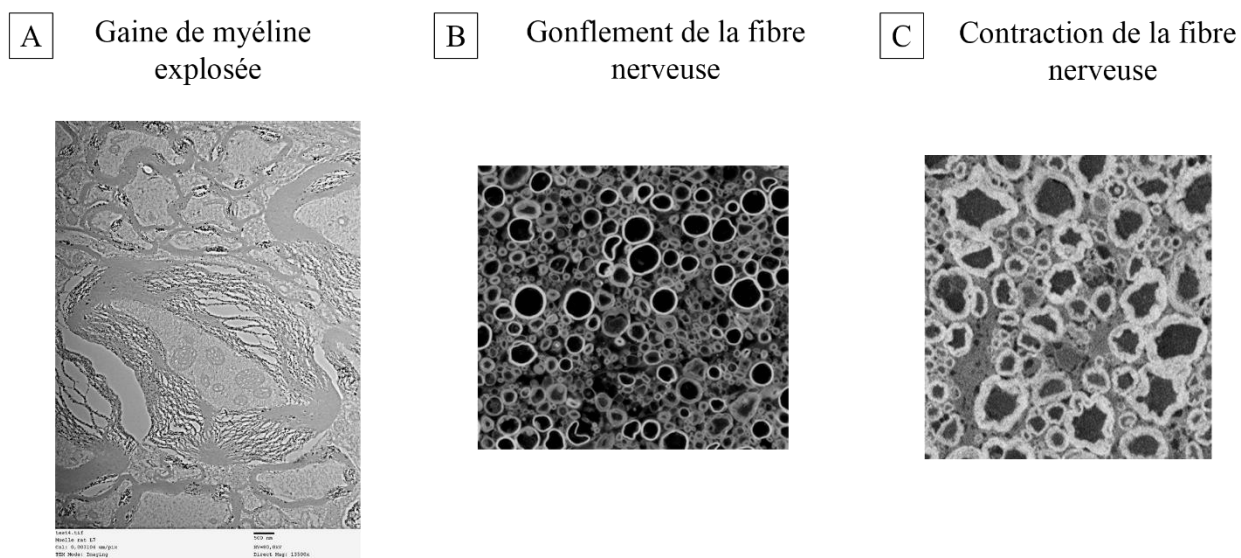


Figure 5-1 : Artéfacts de fixation causés lors de la préparation des tissus.

Nous avons pu remarquer que ce sont les plus gros axones qui sont touchés par les artéfacts de fixation. Cela peut être expliqué de la manière suivante : nous avons vu que les facteurs qui

affectent la qualité de la préparation su tissus sont entre autres l'osmolarité des solutions de fixatifs et la durée de fixation. Les plus gros axones seront plus sensibles à l'osmolarité que les plus petits axones car ils ont un volume intracellulaire plus grand que celui des plus petits axones.

## **5.2 Acquisition au MEB**

Lors de nos acquisitions au MEB (en faible grossissement) une résolution en dessous de 100 nm est difficile à obtenir. On manque alors les plus petits axones : en pratique il est difficile d'obtenir une résolution de 100 nm [118]. Par conséquent, les plus petits axones <100 nm ne sont pas détectés [40]. Ainsi, il est difficile de distinguer les axones avec un diamètre de 500 nm et moins [40] [41] [43].

De plus, au MEB, la gaine de myéline apparaît comme floue sur ses rebords, ce qui peut induire un biais lors de la segmentation.

Nous avons pu également constaté que la qualité du polissage est un paramètre important à prendre en compte pour l'acquisition. En effet, lors du polissage, les nanoparticules utilisées pour polir, peuvent rester à la surface de notre échantillon. De plus, si le polissage est trop brutal, il peut abîmer la surface de l'échantillon.

Il est à noter que le MET a une meilleure résolution mais il est limitée à de petites fenêtres d'acquisition et le CARS semble intéressant mais est limité à une résolution physique optique, mais le tissu n'a pas besoin d'être fixé.

## **5.3 Identification des niveaux vertébraux**

Lorsque l'on extrait la moelle épinière du rat il est très difficile d'identifier les niveaux vertébraux surtout pour des personnes qui n'ont pas de formation en anatomie. C'est pourquoi notre méthode d'identification permet de faciliter cette tâche. Avec notre méthode nous avons réussi à avoir 70.6% d'exactitude pour le niveau cervical, c'est-à-dire que 70.6% de nos coupes histologiques de niveau cervical ont été détectés à 70.6 % comme des niveaux cervicaux (Figure 4-3). Pour le niveau thoracique nous avons obtenu 93% d'exactitude et pour le niveau lombaire 100 % d'exactitude. Cependant il est plus difficile d'identifier un niveau (par exemple T8) au sein de son groupe que d'identifier le groupe (T) (Figure 4-4). En effet les niveaux T8, T9, T11 et T13 ont été confondus avec le niveau T5 par notre modèle de prédiction.

## 5.4 Traitement des données

### 5.4.1 Segmentation automatique par le logiciel AxonSeg

La qualité de la segmentation axonale a été déterminée en calculant le coefficient Dice entre la segmentation automatique par AxonSeg et la segmentation manuelle d'une même région dans chaque tract.

AxonSeg est capable de détecter la plupart des vrais axones avec une sensibilité de plus de 0.8 quel que soit la région de la moelle (Tableau 4-1). On remarque aussi que le coefficient Dice est élevé, plus de 0.7.

On note qu'il y a peu d'écart entre la segmentation automatique par AxonSeg et la segmentation manuelle (ground truth).

Cependant, nos images histologiques ont été acquises avec différents niveaux de contraste et d'intensité. Ainsi certaines images sont plus faciles à segmenter que d'autres selon les niveaux de contraste et d'intensité utilisés.

De plus, l'effet de flou observé sur les contours de la gaine de myéline induit une sur-estimation des métriques.

### 5.4.2 Recalage des cartes moyennées entre rats sur l'atlas de référence

Pour notre méthode de recalage nous avons utilisé une transformation SyN. Après une vérification visuelle du recalage des cartes moyennées entre rats, nous avons pu observer quelques anomalies (Figure 5-2).

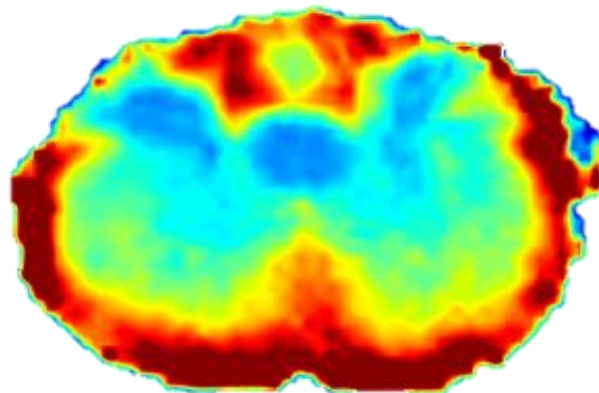


Figure 5-2 : Recalage des cartes moyennées entre rat après une transformation SyN.

Nous remarquons que les contours de la matière blanche ne sont pas nets. En effet, la transformation SyN est une transformation trop brutale pour le recalage. Une alternative pourrait être l'utilisation de la transformation BSpline de l'algorithme Ants.

## **5.5 Création de l'atlas de la matière blanche**

### **5.5.1 Difficulté à déterminer les tracts de la matière blanche**

Jusqu'à présent les atlas ont été construits à partir d'une collection de sections histologiques colorés, produit pour visualiser l'anatomie de la matière blanche. Ces atlas sont seulement basés sur des images histologiques non processées. Les tracts de la matière blanche de la moelle épinière ne sont toujours pas bien délimités; il est probable de trouver la présence de fibres ascendantes dans certains tracts [42] [72] [114].

Plusieurs études se basent sur des localisations de tracts subjectives et approximatives basés sur d'anciens travaux d'atlas [42] [111] [112] [109].

### **5.5.2 Choix de l'atlas de référence**

L'atlas de référence que nous avons choisi pour recalibrer nos images histologiques présentent de nombreux défauts. Dans un premier temps, les tracts représentés sont approximatifs. En effet ils ont été mis en évidence grâce à des modèles de lésions de la moelle [110]. Puis cet atlas ne représente que le niveau cervical et il a été utilisé dans notre étude pour générer notre atlas microstructural de la matière blanche de C1 à S2, en faisant l'hypothèse que la topologie de la matière blanche est conservée le long de la moelle. Cette hypothèse est néanmoins consistante avec les connaissances anatomiques actuelles sur l'organisation interne de la moelle épinière. Dans la direction rostro-caudale, une fois que les voies spinales décussent dans la médulla, elles conservent la même organisation topographique dans le plan axial de C1 à C8 [119]. D'ailleurs, le long des niveaux cervicaux, la proportion de chaque tract de la matière blanche reste relativement constante [13]. Pour s'assurer une déformation légère des tracts le long de l'axe rostro-caudal, nous avons utilisé les transformations affine et SyN qui maintiennent les propriétés topologiques et par conséquent fournissent des solutions plausibles biologiquement quant aux problèmes de déformations et aux estimations morphologiques.

Puis la variabilité inter-sujet n'est pas représentée. En effet des études *ex vivo* [120] et *in vivo* [121] ont montré que les structures internes de la moelle épinière varient d'un sujet à un autre.

De plus quand nous superposons l'atlas de référence sur l'image histologique segmentée, nous observons des inhomogénéités au sein d'un même tract. Certains tracts peuvent être superposés les uns sur les autres. Par exemple les tracts vestibulospinal latéral, spinothalamique ventral et reticulospinal rostral.

## **5.6 Interprétation des cartes**

### **5.6.1 Variabilité inter-rat**

Nous pouvons remarquer que les cartes moyennées pour le diamètre axonal, la densité axonale, l'épaisseur de la gaine de myéline et le g-ratio sont consistantes entre les rats. Par exemple, le diamètre axonal est le plus faible dans le dCST et le plus élevé dans les tracts situés en périphérie de la matière blanche.

Cependant la variabilité inter-rat peut être anatomique ou/et artéfactuelle comme la qualité de la préparation histologique ou encore l'acquisition au MEB.

De plus, il est possible que la composition en fibres varie entre les rats, ce qui peut par conséquent induire un biais dans l'estimation des différents biomarqueurs.

Le g-ratio est connu pour varier entre 0.6 et 0.8 dans le système nerveux central [84] avec une valeur optimale autour de 0.77 [122]. Les plus gros axones sont connus pour avoir une gaine de myéline de faible épaisseur et ainsi un g-ratio plus élevé [123]. Pour un diamètre axonal donné, cependant, le g-ratio est relativement constant dans le SNC et entre les espèces [122].

### **5.6.2 Analyse tractus par tractus**

Nous avons fait l'hypothèse que la microstructure est homogène au sein d'un même tract de la matière blanche de l'atlas de référence, pour chacune des métriques. Cependant, la transition entre deux tracts voisins peut être progressive, entraînant ainsi une microstructure non-homogène. En effet les tracts peuvent se superposer. Premièrement, le tract RST et le tract corticospinal sont des tracts qui se superposent partiellement [103]. Deuxièmement, la délimitation classique des tracts n'est pas basée sur la microstructure mais sur des observations macroscopiques. Par exemple, le



tract FC est séparé du tract FG par un septum [124]. Cependant ce tract est une combinaison de fibres de petit diamètre, qui émergent à partir du niveau thoracique, et de fibres à grand diamètre provenant du niveau C8 [125]. Troisièmement, la délimitation des tracts dans ce projet est basée sur un atlas de référence qui suppose une même parcellation spatiale entre les rats. Cependant, la morphologie de la moelle épinière varie entre les individus [120]. Quatrièmement, la microstructure n'est pas nécessairement homogène le long de la moelle. Ainsi moyenner les métriques microstructurales le long des vertèbres peut introduire une variabilité.

Nous avons pu observer que : le tract dCST contient les plus petits axones avec un diamètre moyen de  $1.46 \pm 0.11 \mu\text{m}$  pour le niveau cervical de  $1.68 \pm 0.15 \mu\text{m}$ , pour le niveau lombaire de  $1.48 \pm 0.1 \mu\text{m}$ , pour le niveau sacral de  $1.41 \pm 0.07 \mu\text{m}$ . Et les plus gros axones sont observés pour ceux du tract vestibulospinal avec un diamètre moyen de  $2.43 \pm 0.24 \mu\text{m}$  pour le niveau cervical de  $2.37 \pm 0.20 \mu\text{m}$ , pour le niveau lombaire de  $2.15 \pm 0.21 \mu\text{m}$ , pour le niveau sacral de  $2.09 \pm 0.22 \mu\text{m}$ .

On observe les mêmes tendances pour la densité axonale et l'épaisseur de la gaine de myéline.

Cependant, le g-ratio reste constant entre les tracts de l'ordre de 0.53-0.59. En effet, il n'y a pas de différence significative du g-ratio entre les tracts.

De plus, nous observons une forte corrélation entre les tracts du côté droit et gauche de la moelle pour le diamètre axone, la densité axonale, l'épaisseur de la gaine de myéline pour tous les niveaux vertébraux.

### **5.6.3 Variabilité entre niveaux vertébraux**

Nous avons observé que le diamètre axonal dans le tract dCST reste le même le long des niveaux C, T, L et S, mais qu'il diminue (du cervical au sacral) dans les tracts RST, FCT et VST.

La densité axonale augmente (du cervical au sacral) dans les tracts VST et RST mais diminue dans le tract dCST.

L'épaisseur de la gaine de myéline diminue (du cervical au sacral) dans tous les tracts.

Bien que le g-ratio reste constant dans la matière blanche, il est maximum au niveau thoracique pour les tracts VST, FG, FC et ReST.

Les explications anatomiques de ces tendances restent à investiguer.

Nous avons aussi mis en évidence les tendances suivantes grâce aux résultats mis en Annexe A :

- plus le diamètre axonal augmente, plus l'épaisseur de la gaine de myéline augmente pour tous les niveaux vertébraux.
- les relations entre le g-ratio vs le diamètre axonal et la densité axonale ne sont pas linéaires mais que l'on peut tout de même observer une diminution du diamètre axonal quand le g-ratio augmente.
- plus le diamètre augmente au sein d'un tract, plus la densité augmente.

#### 5.6.4 Comparaisons avec la littérature

Dans notre revue de littérature, nous avons mentionné qu'il existait très peu d'études sur la microstructure de la matière blanche de la moelle épinière chez le rat. De plus, dans ces études, la microstructure d'un ou deux niveaux vertébraux est prise en compte. Il est donc très difficile pour nous de comparer nos résultats avec ce qui a déjà été fait. De plus, un problème de terminaison subsiste; certains auteurs utilisent le terme « fibre » sans préciser s'ils prennent en compte la gaine de myéline ou non. Par ailleurs, ces études portent seulement sur le niveau cervical.

Harkins et al. [82] avaient trouvé pour le niveau cervical dans le dCST un diamètre moyen de  $1.12 \pm 0.42$  et dans le VST un diamètre moyen de  $2.74 \pm 1.88$  qui sont des valeurs un peu plus élevées que les nôtres.

Nous avons trouvé dans la littérature [82], pour la densité axonale (nombre d'axone/mm<sup>2</sup>) pour le niveau cervical, les valeurs suivantes pour les différents tracts : 344 000±41 000 (dCST), 189 000±49 000 (FG), 93 000±33 000 (FC), 133 000±24 000 (ReST), 100 000±32 000 (RST), et 65 000±16 000 (VST). Dans notre étude, si nous moyennons tous les niveaux cervicaux ensemble et chaque tract gauche et droite ensemble, nous obtenons 236 000±20 000 (dCST), 170 000±12 000 (FG), 136 000±10 000 (FC), 111 000±10 000 (ReST), 131 000±12 000 (RST) et 96 000±11 000.

Nos valeurs sont assez similaires avec celles de la littérature mais il est difficile de faire une comparaison rigoureuse car nous ne savons pas quel niveau Harkins et al. ont utilisé pour leur étude.

## 5.7 Directions futures

Ce projet n'est encore tout à fait terminé, avant de pouvoir publier nos résultats, il nous faut des coupes histologiques d'au moins 5 rats pour chaque niveau pour pouvoir mesurer la variabilité inter-rats, réaliser des tests statistiques comme un 3-ways ANOVA pour comparer les quatre groupes suivants entre eux : rats, tract, latéralité gauche/droite (hypothèse nulle  $H_0$  : pour une même métrique la moyenne est la même pour tous les groupes. Si  $p < 0.05$  on rejette  $H_0$ ).

De plus il serait intéressant de valider nos résultats en comparant nos résultats obtenus au MEB avec ceux obtenus au MET.

## **CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

### **6.1 Contributions au projet de recherche à l'avancement des connaissances**

Imager la section de la moelle au complet en utilisant un protocole d'histologie optimal, un algorithme d'assemblage d'images et une segmentation automatique permet d'étudier toute la moelle et les tracts de la matière blanche en réduisant le temps d'acquisition et le temps d'analyse pour ainsi permettre d'étudier plus d'échantillons.

Cette étude a permis de créer un atlas, i.e. une cartographie de la microstructure de la matière blanche, au complet, de la moelle épinière ce qui sera utile pour étudier les pathologies de la moelle épinière, telles que les maladies démyélinisantes.

### **6.2 Applications**

Les méthodes développées et les résultats obtenus auront un impact sur le patient et dans le domaine de la recherche : cet atlas servira de référence pour les études de lésions de la matière blanche de la moelle épinière; à savoir l'impact d'un traumatisme sur la microstructure de la moelle. Détailler la morphométrie de chaque tract de la matière blanche à chaque niveau permettre de fournir une information directe sur le type et l'étendue du dommage dans une région spécifique de la moelle épinière.

Puis, les méthodes développées dans ce projet pourront être utilisées pour créer le même atlas chez l'homme.

Enfin, ce travail permettra aux chercheurs d'utiliser notre atlas pour valider des techniques d'imagerie telle que l'IRM sur des sujets sains et malades et ainsi permettre un meilleur diagnostic des patients atteints de démyélinisation.

### **6.3 Recommandations**

La perfusion pour l'étude histologique permet une meilleure préservation du tissu que l'immersion. Il est recommandé de perfuser avec Ga et PFA qui ont tous les deux des actions complémentaires. La fixation du tissu dans la solution de fixatifs après perfusion ne devrait pas excéder plus de 3 jours pour éviter tout artefact de fixation. De plus il est suggéré de déshydrater le tissu dans plusieurs bains d'acétone de concentration graduelle. Pour l'acquisition au MEB des coupes

histologiques, le détecteur LBE permet d'avoir une information de surface et est donc très adapté pour acquérir un grand volume de tissu (de l'ordre du mm).

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] «Agence de la santé publique du Canada,» 12 07 2016. [En ligne]. Available: <http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/ms-sp/index-fra.php>.
- [2] A. Pietrangelo et V. Higuera, «Multiple Sclerosis by the Numbers: Facts, Statistics, and You,» 24 03 2015. [En ligne]. Available: <http://www.healthline.com/health/multiple-sclerosis/facts-statistics-infographic>.
- [3] E. Park et A. A. .. F. M. G. Velumian, «The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration,» *Journal of Neurotrauma*, vol. 21, n° %11, pp. 754-774, 2004.
- [4] C. H. Tator et M. G. Fehlings, «Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms,» *Journal of Neurosurgery*, vol. 75, n° %11, pp. 15-26, 1991.
- [5] D. H. Lee et J. K. Lee, «Animal models of axon regeneration after spinal cord injury,» *Neurosci Bull* , vol. 29, n° %14, pp. 436-444, 2013.
- [6] Y. S. Nout, E. S. Rosenzweig, J. H. Brock, S. C. Strand, R. Moseanko, S. Hawbecker, S. Zdunowski, J. L. Nielson, R. R. Roy, G. Courtine et e. al., «Animal models of neurologic disorders: a nonhuman primate model of spinal cord injury,» *Neurotherapeutics*, vol. 9, n° %12, pp. 380-392, 2012.
- [7] N. A. Silva, N. Sousa, R. L. Reis et A. J. Salgado, «From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury,» *Progress in Neurobiology*, vol. 114, pp. 25-57, 2014.
- [8] J. A. Perge, J. E. Miven, E. Mugnaini, V. Balasubramanian et P. Sterling, «Why do axons differ in caliber?,» *J Neurosci.*, vol. 32, n° %12, pp. 626-638, 2012.

- [9] C. S. o. Medicine, «COMMON SPINAL CORD SYNDROMES,» 17 07 2006. [En ligne]. Available:  
<http://casemed.case.edu/clerkships/neurology/NeurLrngObjectives/Spinal%20cord.htm>.
- [10] M. Fishbein, *The New Illustrated Medical and Health Encyclopedia*, New York: H. S. Stuttman, 1970.
- [11] C. S. o. Medicine, «Common spinql cord syndromes,» 17 07 2017. [En ligne]. Available:  
<http://casemed.case.edu/clerkships/neurology/NeurLrngObjectives/Spinal%20cord.htm>.
- [12] «Biol 1761 Lecture Outline Fall 2006, Ch. 13 The Central Nervous System: Brain and Spinal Cord,» 2006. [En ligne]. Available:  
[http://www.d.umn.edu/~lholmstr/Biol1761/LectureOutlineCh13\\_000.htm](http://www.d.umn.edu/~lholmstr/Biol1761/LectureOutlineCh13_000.htm).
- [13] S. Standring, *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, Elsevier Health Sciences UK, 2008.
- [14] A. Siegel et H. Sapru, *Essential neuroscience*, Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [15] I. Genius Media Group, «Structure and Function of the Nervous System I,» [En ligne]. Available: <https://genius.com/Human-physiology-structure-and-function-of-the-nervous-system-i-annotated>.
- [16] R. Remak, *Über die Ganglien der Herznerven des Menschen und deren physiologische Bedeutung*, vol. 14, W. g. Heilk, Éd., 1839, pp. 149-154.
- [17] R. Virchow, *Über das ausgebreitete Vorkommen einer dem Nervenmark analogen Substanz in den tierischen Geweben*, vol. 6, Arch. Pathol. Anat. Physiol. klin. Med., 1854, p. 562–572.
- [18] U. Fünfschilling, L. Supplie, D. Mahad, S. Boretius, A. Saab, J. Edgar, B. Brinkmann, C. Kassmann, I. Tzvetanova, W. Möbius, F. Diaz, D. Meijer, U. Suter, B. Hamprecht, M. Sereda, C. Moraes, J. Frahm, S. Goebels et K. Nave, «Glycolytic oligodendrocytes

- maintain myelin and long- term axonal integrity,» *Nature*, vol. 485, n° %17399, pp. 517-521, 2012.
- [19] R. Louis-Antoine, *Leçons sur l'histologie du système nerveux*, M. Ed. Weber, 1878.
- [20] E. Wisse, F. Braet, H. Duimel, C. Vreuls, G. Koek, S. W. Olde Damink, M. A. van den Broek, B. De Geest, C. H. Dejong, C. Tateno et P. Frederik, «Fixation methods for electron microscopy of human and other liver,» *World Journal of Gastroenterology : WJG*, vol. 16, n° %123, pp. 2851-2866, 2010.
- [21] L. A. Langford et R. E. Coggeshall, «Unmyelinated axons in the posterior funiculi,» *Science*, vol. 211, n° %14478, pp. 176-177, 1981.
- [22] S. Palay, S. McGee-Russell, S. Gordon et M. Grillo, «Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide,» *The Journal of cell biology*, vol. 12, n° %12, pp. 385-410, 1962.
- [23] T. Williams et J. Jew, «An improved method for perfusion fixation of neural tissues for electron microscopy,» *Tissue and Cell*, vol. 7, n° %13, pp. 407-418, 1975.
- [24] L. Chang et W. Slikker, *Neurotoxicology: Approaches and Methods.*, Elsevier Science, 1995.
- [25] A. Fix et R. Garman, «Practical aspects of neuropathology: a technical guide for working with the nervous system,» *Toxicologic Pathology*, vol. 28, n° %11, pp. 122-131, 2000.
- [26] R. Lamberts et P. Goldsmith, «Fixation, Fine structure and immunostaining for neuropeptides: perfusion versus immersion of the neuroendocrine hypothalamus,» *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 34, n° %15, pp. 389-398, 1985.
- [27] J. Bancroft, *Theory and Practice of Histological Techniques*, Elsevier Health Science, 2008.
- [28] M. Hayat, *Fixation for Electron Microscopy*, Elsevier, 2012.



- [29] M. Karnovsky, «A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy,» *The Journal of Cell Biology*, pp. 1A-149A, 1965.
- [30] M. Dykstra et L. Reuss, *Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting*, Springer US, 2003.
- [31] A. Glauert et P. Lewis, *Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy*, Princeton University Press, 2014.
- [32] J. J. Bozzola et D. R. Lonnie, *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*, Sudbury: Jones & Bartlett Publishers, 1992.
- [33] R. Thavarajah, V. K. Mudimbaimannar, J. Elizabeth, U. K. Rao et K. Ranganathan, «Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation,» *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP* , vol. 16, n° %13, pp. 400-405, 2012.
- [34] C. J. Yong-Hing, A. Obenaus, R. Stryker, K. Tong et G. E. Sarty, «Magnetic resonance imaging and mathematical modeling of progressive formalin fixation of the human brain,» *Magn Reson Med*, vol. 54, n° %12, pp. 324-332, 2005.
- [35] H. Mehrer et N. A. Stolwijk, «Heroes and highlights in the history of diffusion.,» *Diffusion Fundamentals*, pp. 1-32, 2009.
- [36] J. V. Johannessen, «Use of paraffin material for electron microscopy,» *Pathol Annu*, vol. 12, n° %12, pp. 189-224, 1977.
- [37] Y. L. Hua, P. Laserstein et M. Helmstaedter, «Large-volume en-bloc staining for electron microscopy-based connectomics,» *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 7923, 2015.
- [38] S. Mikula, J. Binding et W. Denk, «Staining and embedding the whole mouse brain for electron microscopy,» *Nat. Methods*, vol. 9, pp. 1198-1201, 2012.

- [39] D. D. Ralston, A. Milriy et H. J. Ralston, «Non-myelinated axons are rare in the medullary pyramids of the macaque monkey,» *Neuroscience Letters*, vol. 73, pp. 215-219, 1987.
- [40] L. Firmin, P. Field, M. A. Maier, A. Kraskov, P. A. Kirkwood, K. Nakajima, R. N. Lemon et M. Glickstein, «Axon diameters and conduction velocities in the macaque pyramidal tract,» *Journal of Neurophysiology*, vol. 118, pp. 1229-1240, 2014.
- [41] M. Biedenbach, J. De Vito et A. Brown, «Pyramidal tract of the cat: axon size and morphology,» *Experimental Brain Research*, vol. 61, pp. 303-310, 1986.
- [42] L. Leenen, J. Meek, P. R. Posthuma et R. Nieuwenhuys, «A detailed morphometrical analysis of the pyramidal tract of the rat,» *Brain research*, vol. 359, pp. 65-80, 1985.
- [43] G. Harding et A. Towe, «Fiber analysis of the pyramidal tract of the laboratory rat,» *Experimental Neurology*, vol. 87, pp. 503-518, 1985.
- [44] Y. Souma, N. Goto, J. Goto, T. Fujimoto et T. Fujiwara, «Morphological evaluation of the human pyramidal tract : tapering of axons,» *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, vol. 85, n° %14, pp. 111-113, 2009.
- [45] R. L. Schultz et U. Karlsson, «Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. II. Effect of osmolarity, pH of perfusate, and fixative concentration,» *Journal of Ultrastructure Research*, vol. 12, n° %11-2, pp. 187-206, 2006.
- [46] A. Ohnishi, P. C. O'Brien, H. .. Okazaki et P. J. Dyck, «Morphometry of myelinated fibers of fasciculus gracilis of man,» *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 27, n° %12, pp. 163-172, 1976.
- [47] E. E. Hunter, P. Maloney et M. Bendayan, *Practical Electron Microscopy: A Beginner's Illustrated Guide*, Cambridge University Press., 1993.

- [48] S. S. Cross, R. D. Start et J. H. Smith, «Does delay in fixation affect the number of mitotic figures in processed tissue?,» *Journal of Clinical Pathology*, vol. 43, n° %17, pp. 597-599, 1990.
- [49] A. Peters, «The fixation of central nervous tissue and the analysis of electron micrographs of the neuropil, with special reference to the cerebral cortex,» *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*, pp. 56-75, 1970.
- [50] B. GR., «The current status of fixation for electron microscopy: a review,» *J Microscopy*, vol. 133, pp. 1-15, 1984.
- [51] J. Bruce-Gregorios, *Histopathologic Techniques*, Goodwill Trading Co., Inc., 2006.
- [52] T. Fujimoto, Y. Ohsaki, M. Suzuki et J. Cheng, «Imaging lipid droplets by electron microscopy,» *Methods in Cell Biology*, vol. 116, pp. 227-251, 2012.
- [53] L. A. Langford et R. E. Coggeshall, «The use of potassium ferricyanide in neural fixation,» *The Anatomical Record*, vol. 197, n° %13, pp. 297-303, 1980.
- [54] J. D. Robertson, «New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers,» *Journal of Biophysical and biochemical cytology*, vol. 3, n° %16, pp. 1043-1048, 1957.
- [55] S. A. Luse, «ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM,» *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, vol. 2, n° %15, pp. 531-542, 1956.
- [56] S. Rana, *Biotechniques: Theory and Practice.*, New Delhi: Rastogi Publications, 2008.
- [57] J. D. Bancroft et M. and Gamble, *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone., Churchill Livingstone, 2002.

- [58] J. S. Lowe et P. G. Anderson, Stevens & Lowe's Human Histology: With STUDENT CONSULT Online Access, Elsevier Health Sciences UK, 2014.
- [59] D. C. Sheehan et B. B. Hrapchak, Theory and practice of histotechnology, Mosby, Incorporated, 1980.
- [60] [En ligne]. Available: [http://act.downstate.edu/courseware/neurohisto\\_slides/slide02/1x\\_cervical\\_cord.html](http://act.downstate.edu/courseware/neurohisto_slides/slide02/1x_cervical_cord.html).
- [61] A. Bajaj, N. E. LaPlante, V. E. Cotero, K. M. Fish, R. M. Bjerke et T. Siclovan, «Identification of the protein target of myelin-binding ligands by immunohistochemistry and biochemical analyses,» *J Histochem Cytochem*, vol. 31, n° 11, pp. 19-30, 2013.
- [62] H. Wang, Y. Fu, P. Zickmund, R. Shi et J.-X. Cheng, «Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Imaging of Axonal Myelin in Live Spinal Tissues,» *Biophysical Journal*, vol. 89, n° 11, pp. 581-591, 2005.
- [63] C. Wang, D. C. Popescu, C. Wu, J. Zhu, W. Macklin et Y. Wang, «In Situ Fluorescence Imaging of Myelination,» *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 58, n° 17, pp. 611-621, 2010.
- [64] E. Bélanger, S. Bégin, S. Laffray, Y. De Koninck, R. Vallée et D. Côté, «Quantitative myelin imaging with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: alleviating the excitation polarization dependence with circularly polarized laser beams,» *Optics Express*, vol. 17, n° 121, pp. 18419-18432, 2009.
- [65] G. De Vito, A. Canta, P. Marmioli et V. Piazza, «A large-field polarisation-resolved laser scanning microscope: applications to CARS imaging,» *Journal of Microscopy*, vol. 260, n° 12, pp. 194-199, 2015.
- [66] J. Imitola, D. Côté, S. X. S. Rasmussen, Y. Liu et T. e. a. Chitnis, «Multimodal coherent anti-Stokes Raman microscopy reveals microglia-associated myelin and axonal dysfunction

- in multiple sclerosis-like lesions in mice,» *Journal of biomedical optics*, vol. 16, n° 12, 2011.
- [67] F. P. Henry, D. Côté, M. A. Randolph, E. A. Rust, R. W. Redmond et I. E. e. a. Kochevar, «Real-Time In Vivo Assessment of the Nerve Microenvironment with Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. 123(2S),» *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 123, n° 12S, pp. 123S-130S, 2009.
- [68] E. Bélanger, F. Henry, R. Vallée, M. Randolph, I. Kochevar et J. e. a. Winograd, «In vivo evaluation of demyelination and remyelination in a nerve crush injury model,» *Biomedical optics express*, vol. 2, n° 19, pp. 2698-2708, 2011.
- [69] M. Freebody, «Challenges to CARS Microscopy: Light at the End of the Tunnel,» chez *BioPhotonics*, 2014.
- [70] L. Allen, S. Anderson, R. Wender, P. Meakin, B. Ransom, D. Ray et A. Brown, «Fructose Supports Energy Metabolism of Some, But Not All, Axons in Adult Mouse Optic Nerve,» *Journal of neurophysiology*, vol. 95, n° 13, pp. 1917-1925, 2006.
- [71] B. Fortune, J. Reynaud, G. Cull, C. F. Burgoyne et L. Wang, «The effect of Qge on Optic Nerve Axon Counts, SDOCT Scan Quality, and Peripapillary Retinal Nerve Fiber Layer Thickness Measurements in Rhesus Monkeys,» *Transl Vis Sci Technol*, vol. 3, n° 13, p. 2, 2014.
- [72] L. Leenen, J. Meek et R. Nieuwenhuys, «Unmyelinated fibers in the pyramidal tract of the rat: a new view,» *Brain research*, vol. 246, pp. 297-301, 1982.
- [73] K. Chung et R. E. Coggeshall, «Numbers of axons in lateral and ventral funiculi of rat sacral spinal cord,» *Journal of Comparative Neurology*, vol. 214, n° 11, pp. 72-78, 1983.
- [74] C. Brosamle et M. Schwab, «Ipsilateral, ventral corticospinal tract of the adult rat: ultrastructure, myelination and synaptic connections,» *Journal of Neurocytology*, vol. 29, pp. 449-507, 2000.

- [75] J. Ritchie, «On the relation between fibre diameter and conduction velocity in myelinated nerve fibres,» *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*, vol. 217, pp. 29-35, 1982.
- [76] A. Brun et E. Englund, «A white matter disorder in dementia of the Alzheimer type: a pathoanatomical study,» *Ann Neurol.*, vol. 19, pp. 253-262, 1986.
- [77] G. Lovas, N. Szilagyi, K. Majtényi, M. Palkovits et S. Komoly, «Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques,» *Brain*, vol. 123, pp. 308-317, 2000.
- [78] E. Wilkinson, L. Bridges et S. Sivaloganathan, «Correlation of survival time with size of axonal swellings in diffuse axonal injury,» *Acta Neuropathol.*, vol. 98, pp. 197-202, 1999.
- [79] H. Johansen-Berg et B. T. E. J., «Diffusion MRI: From Quantitative Measurement to In vivo Neuroanatomy,» *Elsevier Science*, 2013.
- [80] D. Nunes, T. L. Cruz, S. N. Jespersen et N. Shemesh, «Mapping axonal density and average diameter using non-monotonic time-dependent gradient-echo MRI,» *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 277, pp. 117-130, 2017.
- [81] J. Xu, H. Li, K. D. Harkins, X. Jiang, J. Xie, K. Hakmook, M. D. Does et J. C. Gore, «Mapping mean axon diameter and axonal volume fraction by MRI using temporal diffusion spectroscopy,» *NeuroImage*, vol. 103, pp. 10-19, 2014.
- [82] K. D. Harkins, A. N. Dula et M. D. Does, «The effect of inter-compartmental water exchange on the apparent myelin water fraction in multi-exponential T2 measurements of rat spinal cord,» *Magn Reson Med.*, vol. 67, n° 13, pp. 793-800, 2012.
- [83] K. D. Harkins, J. Xu, A. N. Dula, K. Li, W. M. Valentine, D. F. Gochberg, J. C. Gore et M. D. Does, «The microstructural correlates of T1 in white matter,» *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 75, pp. 1341-1345, 2016.
- [84] W. Rushton, «A theory of the effects of fibre size in medullated nerve,» *The Journal of physiology*, vol. 115, n° 11, pp. 101-122, 1951.

- [85] K. D. Graf et U. Schramm, «Diameters of axons and thickness of myelin sheaths of the pyramidal tract fibres in the adult human medullary pyramid,» *Anatomischer Anzeiger*, vol. 157, n° %12, pp. 97-111, 1983.
- [86] A. L. Towe et E. S. Luschei, «Motor Coordination,» *Springer US*, 2013.
- [87] H. Van Crevel et W. J. C. Verhaart, «The rate of secondary degeneration in the central nervous system I. The pyramidal tract of the cat,» *Journal of Anatomy*, vol. 97, n° %18, pp. 429-449, 1963.
- [88] S. Yang, C. Li, W. Zhang, W. Wang et Y. Tang, «Sex differences in the white matter and myelinated nerve fibers of Long-Evans rats,» *Brain Research*, vol. 1216, pp. 16-23, 2008.
- [89] M. Zhou, N. Goto, N. Otsuka, H. Moriyama et Y. Nakamura, «Morphometric analyses of axons in the lateral corticospinal tract with ageing process,» *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, vol. 74, n° %14, pp. 133-138, 1997.
- [90] M. Cerghet, R. P. Skoff, D. Bessert, Z. Zhang, C. Mullins et G. M. S., «Proliferation and death of oligodendrocytes and myelin proteins are differentially regulated in male and female rodents,» *Journal of Neuroscience*, vol. 26, n° %15, pp. 1439-1447, 2006.
- [91] M. F. Bear, B. W. Connors et M. A. Paradiso, *Neuroscience: Exploring the Brain*, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- [92] S. M. Breedlove et A. P. Arnold, «Hormone accumulation in a sexually imorphic motor nucleus of the rat spinal cord,» *Science*, vol. 210, n° %14469, pp. 564-566, 1980.
- [93] C. K. Wagner et L. G. Clemens, «Projections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus to the sexually dimorphic lumbosacral region of the spinal cors,» *Brain Research*, vol. 539, n° %12, pp. 25-262, 1991.
- [94] F. Nottebohm et A. P. Arnold, «Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain,» *Science*, vol. 194, pp. 211-213, 1976.

- [95] M. A. Yates et J. M. Juraska, «Increases in size and myelination of the rat corpus callosum during adulthood are maintained into old age,» *Brain Research*, vol. 1142, pp. 13-8, 2007.
- [96] J. L. Nunez, J. Nelson, J. C. Pych, J. Y. Kim et J. M. Juraska, «Myelination in the splenium of the corpus callosum in adult male and female rats,» *Dev Brain Res*, vol. 120, pp. 87-90, 2000.
- [97] I. Jung-Testas et E. E. Baulieu, «Steroid hormone receptors and steroid action in rat glial cells of the central and peripheral nervous system,» *Journal of Steroid Biochem Mol Biol*, vol. 65, pp. 243-251, 1998.
- [98] A. Jeronimo, C. Jeronimo, O. Filho, L. Sanada et V. Fazan, «Microscopic anatomy of the sural nerve in the postnatal developing rat: a longitudinal and lateral symmetry study,» *Journal of Anatomy*, vol. 206, pp. 93-99, 2005.
- [99] N. Soltanpour, Y. A. Vostacolae et M. Pourghasem, «Comparison of morphometric aspects of light and electron microscopy of the hypoglossal nerve between young and aged male wistar rats,» *Cell Journal*, vol. 13, n° 14, pp. 229-236, 2012.
- [100] K. Watanabe, K. Kondo, T. Yamasoba et K. Kaga, «Age-related change in the axonal diameter of the olfactory nerve in mouse lamina propria,» *Acta Otolaryngol Suppl*, vol. 559, pp. 108-112, 2007.
- [101] S. Terao, G. Sobue, Y. Hashizume, N. Shimada et T. Mitsuma, «Age-related changes of the myelinated fibers in the human corticospinal tract: a quantitative analysis,» *Acta Neuropathologica*, vol. 88, pp. 137-142, 1994.
- [102] J. Hanaway, T. A. Woolsey, M. H. Gado et M. P. Roberts, «The Brain Atlas: A visual guide to the human central nervous system,» *Wiley*, 1998.
- [103] J. Aitman et S. A. Bayer, «Development of the human spinal cord: an interpretation based on experimental studies in animals,» *Oxford University Press*, 2001.



- [104] C. Kobbert, R. Apps, I. Bechmann, J. L. Lanciego, J. Mey et S. Thanos, «Current concepts in neuroanatomical tracing,» *Progress in Neurobiology*, vol. 62, n° 14, pp. 327-351, 2000.
- [105] A. Reiner, C. L. Veenman, L. Medina, Y. Jiao, N. Del Mar et M. G. Honig, «Pathway tracing using biotinylated dextran amines,» *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 103, n° 11, pp. 23-37, 2000.
- [106] A. Vercelli, M. Repici, D. Garbossa et A. Grimaldi, «Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals,» *Brain Research Bulletin*, vol. 51, n° 11, pp. 11-28, 2000.
- [107] D. L. Sparks, L.-F. Lue, T. A. Martin et J. Rogers, «Neural tract tracing using Di-I: a review and a new method to make fast Di-I faster in human brain,» *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 13, n° 14, pp. 3-10, 2000.
- [108] H. Fuller et M. Gates, *Recovery of Motor Function Following Spinal Cord Injury*, InTech, 2016.
- [109] C. Watson, G. Paxinos et G. Kayalioglu, «The spinal cord: A christopher and Dana Reeve foundation text and atlas,» *Elsevier Science*, 2009.
- [110] E. D. Schwartz, C.-L. Chin, J. S. Shumsky, A. F. Jawad, B. K. Brown, S. Wehrli, A. Tessler, M. Murray et D. B. Hackney, «Apparent Diffusion Coefficients in Spinal Cord Transplants and Surrounding White Matter Correlate with Degree of Axonal Dieback After Injury in Rats,» *American Journal of Neuroradiology*, vol. 26, n° 11, pp. 7-18, 2005.
- [111] G. Meurant, «Descending pathways to the spinal cord,» *Elsevier Science*, 2011.
- [112] C. Watson et M. Harrison, «The location of the major ascending and descending spinal cord tracts in all spinal cord segments in the mouse: actual and extrapolated,» *The anatomical record*, vol. 295, n° 110, pp. 1692-1697, 2012.

- [113] S. Lévy, M. Benhamou, C. Naaman, P. Rainville, V. Callot et J. Cohen-Adad, «White matter atlas of the human spinal cord with estimation of partial volume effect,» *NeuroImage*, vol. 119, pp. 262-271, 2015.
- [114] A. Thomas, L. E. Westrum, J. I. Devito et M. A. Biedebach, «Unmyelinated axons in the pyramidal tract of the cat,» *Brain research*, vol. 301, pp. 162-165, 1984.
- [115] J. H. Luft, «Improvements in epoxy resin embedding methods,» *J Biophys Biochem Cytol*, vol. 9, n° 12, pp. 409-414, 1961.
- [116] A. Zaimi, T. Duval, A. Gasecka, D. Côté, N. Stikov et J. Cohen-Adad, «Open Source Software for Axon and Myelin Segmentation and Morphometric Analysis,» *Frontiers in Neuroinformatics*, vol. 10, n° 137, 2016.
- [117] B. B. Avants, N. J. Tustison, J. Song, P. A. Cook, A. Klein et J. C. Gee, «A reproducible evaluation of ANTs similarity metric performance in brain image registration,» *NeuroImage*, vol. 54, n° 13, pp. 2033-2044, 2011.
- [118] M. J. Madou, *From MEMS to Bio-MEMS and Bio-NEMS: Manufacturing Techniques and Applications*, CRC Press, 2011.
- [119] T. Pritchard et K. Alloway, *Spinal cord and peripheral nerves*, Medical Neuroscience, Hayes Barton Press, 1999.
- [120] T. Kameyama, Y. Hashizume et G. Sobue, «Morphologic features of the normal human cadaveric spinal cord,» *Spine*, vol. 21, pp. 1285-1290, 1996.
- [121] L. Fradet, P. Arnoux, J. Ranjeva, Y. Petit et V. Callot, «Morphometrics of the entire human spinal cord and spinal canal measured from in vivo high-resolution anatomical magnetic resonance imaging,» *Spine*, vol. 39, pp. E262-E269, 2014.
- [122] T. Chomiak et B. Hu, «What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach,» *PLoS One*, vol. 4, p. e7754, 2009.

- [123] M. Ikeda et Y. Oka, «The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration,» *Brain Behav.*, vol. 2, pp. 382-390, 2012.
- [124] H. Gray, S. Standring, H. Ellis et B. Berkovitz, *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, Elsevier Churchill Livingstone , 2005.
- [125] M. Carpenter, *Human Neuroanatomy*, Williams and Wilkins Company, 1976.

## ANNEXE A – RESULTATS SUPPLÉMENTAIRES

### A.1 Diamètre axonal vs épaisseur de la gaine de myéline

Nous observons une très bonne corrélation entre le diamètre axonal et l'épaisseur de la gaine de myéline (Figure A-1) : plus le diamètre axonal est élevé, plus l'épaisseur de la gaine de myéline est élevée. On observe cette tendance pour tous les niveaux vertébraux.

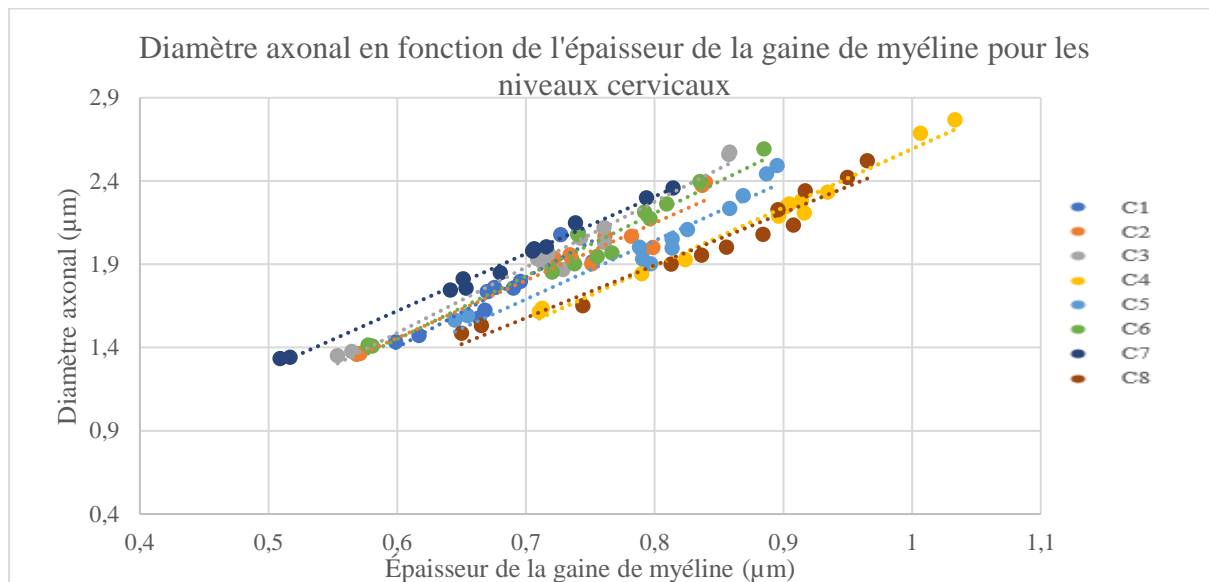


Figure A-1 : Diamètre axonal vs épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres cervicales.

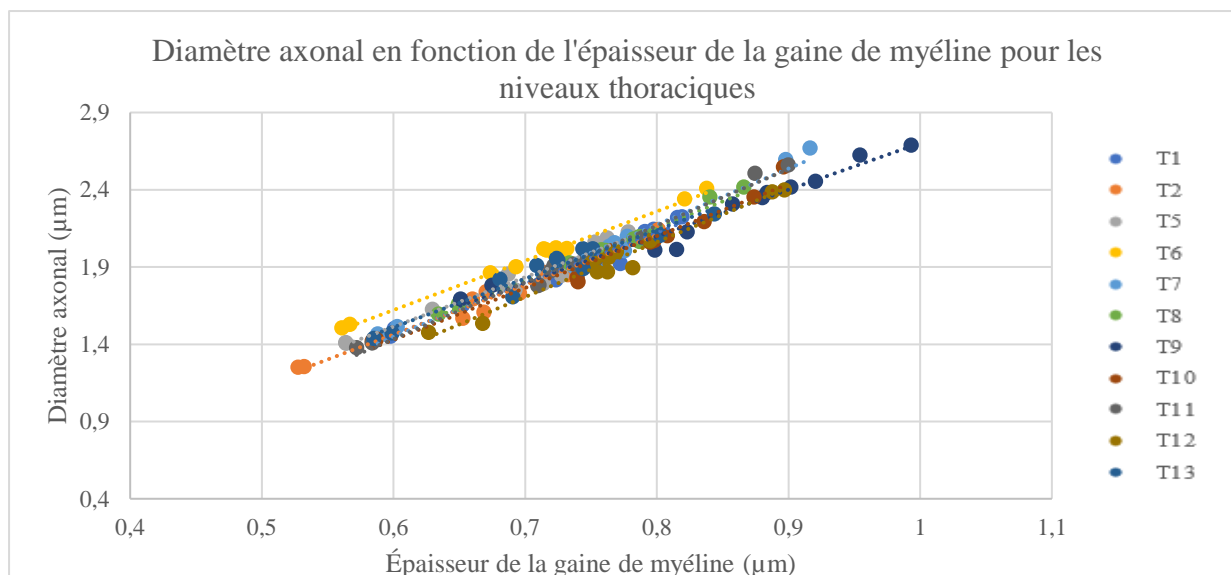


Figure A-2 : Diamètre axonal vs épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres thoraciques.

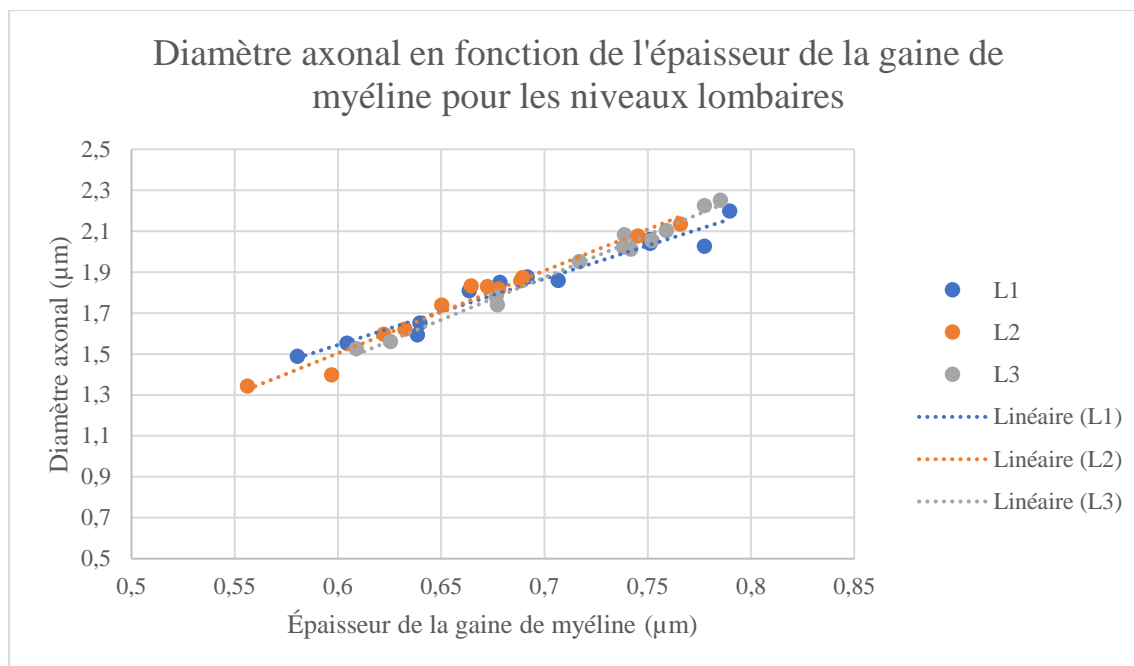


Figure A-3: Diamètre axonal vs épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres lombaires.

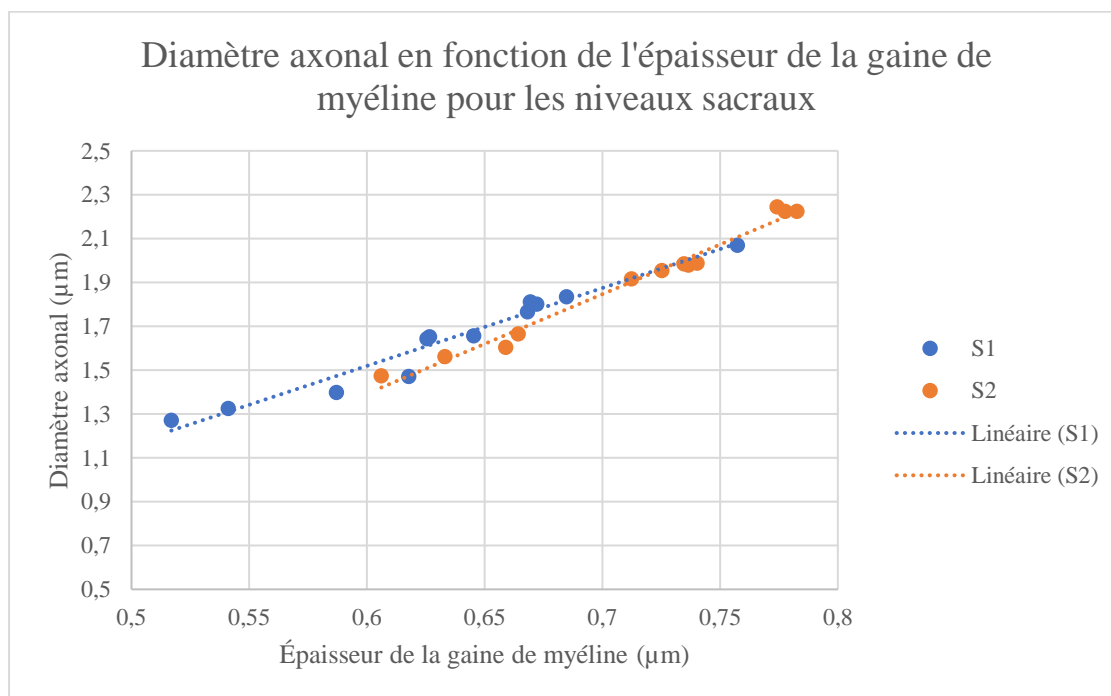


Figure A-4: Diamètre axonal vs épaisseur de la gaine de myéline le long des vertèbres sacrales.

## A.2 Diamètre axonal vs g-ratio

Nous observons également une corrélation entre le g-ratio et le diamètre axonal : le g-ratio tend à augmenter lorsque le diamètre axonal diminue.

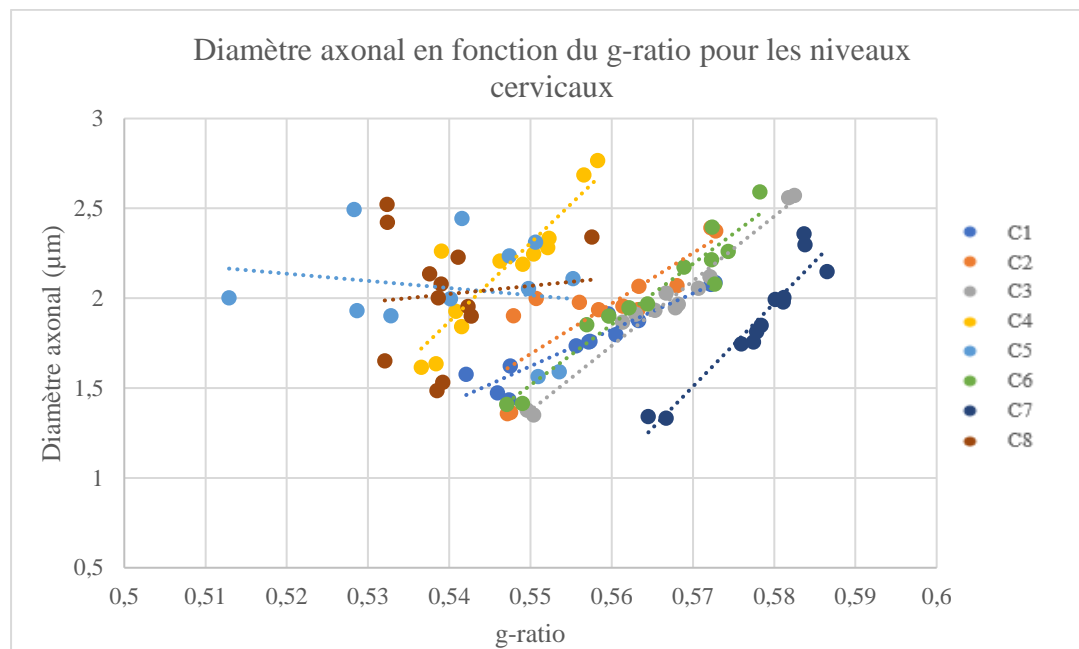


Figure A-5: Diamètre axonal vs g-ratio le long des vertèbres cervicales.

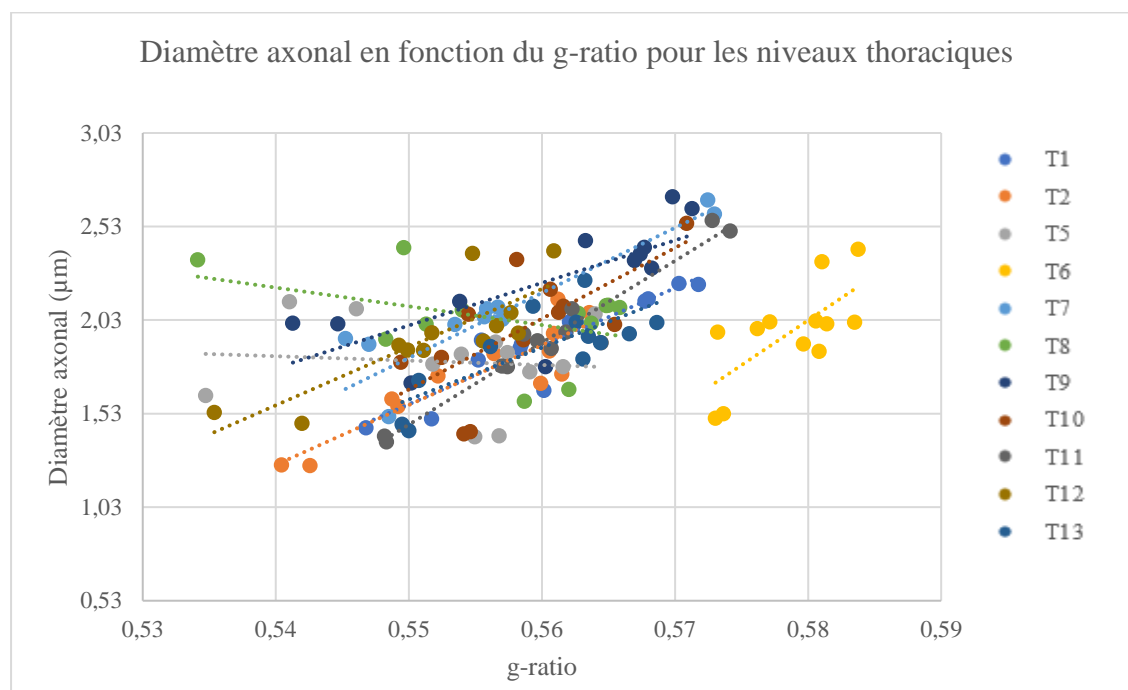


Figure A-6: Diamètre axonal vs g-ratio le long des vertèbres thoraciques.

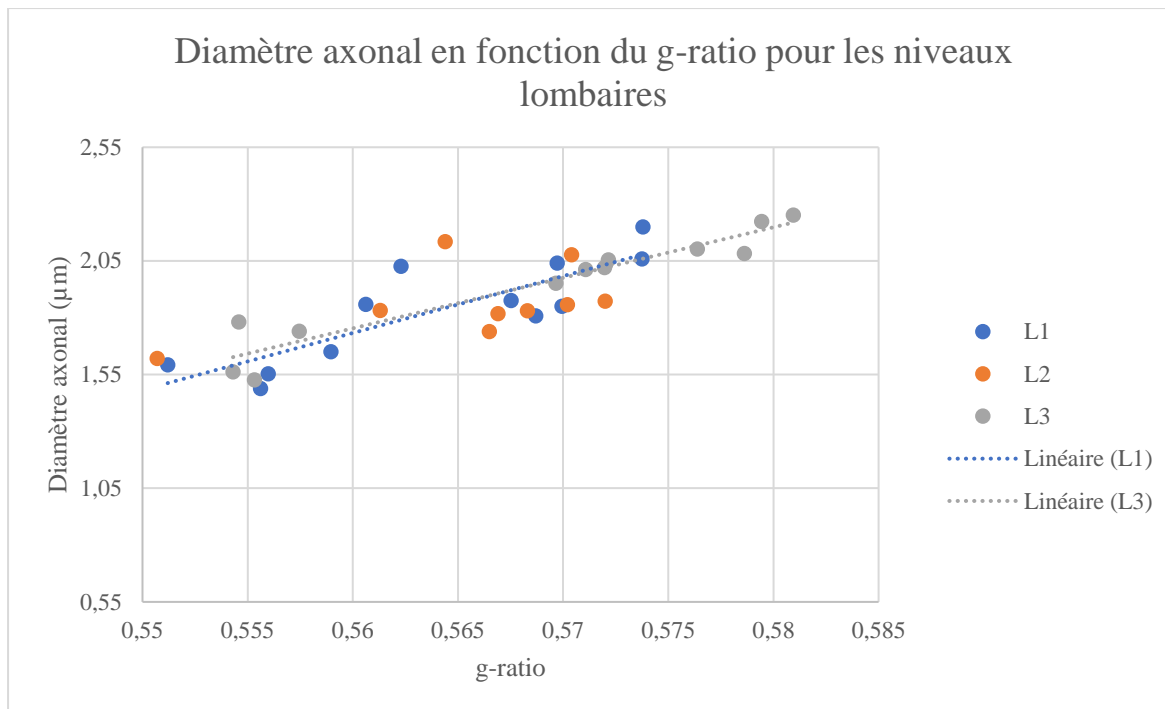


Figure A-7 : Diamètre axonal vs g-ratio le long des vertèbres lombaires.

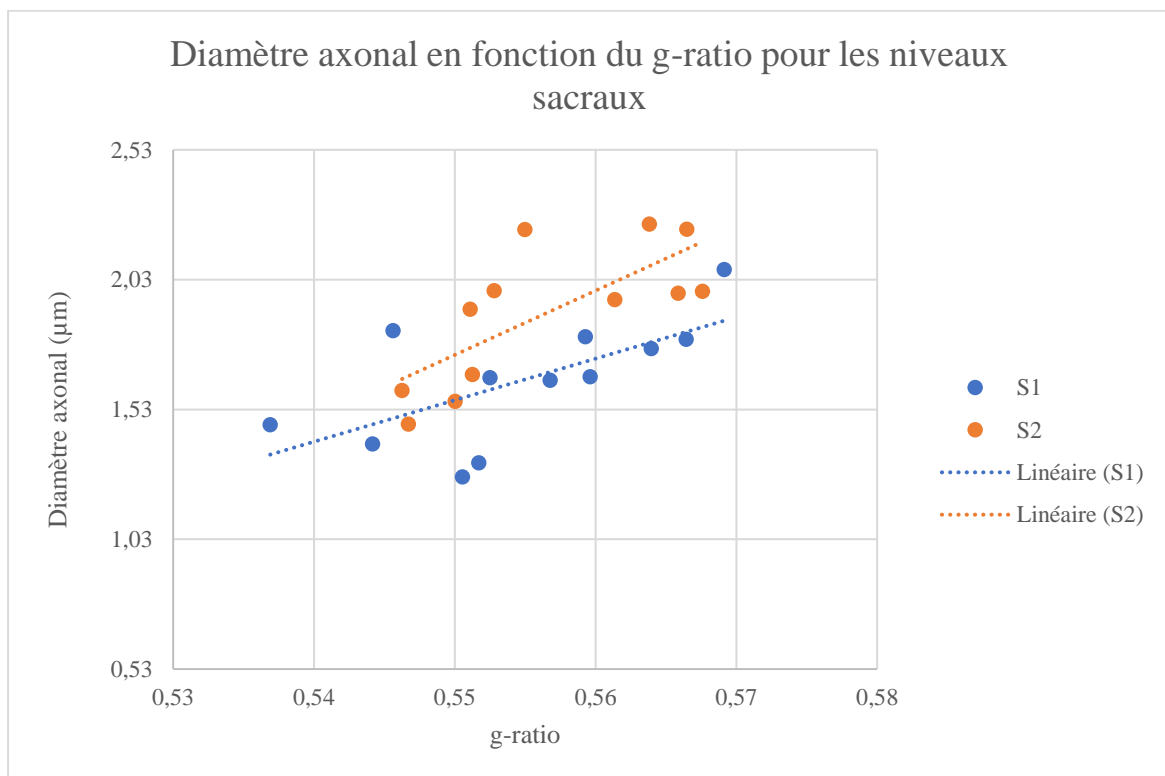


Figure A-8 : Diamètre axonal vs g-ratio le long des vertèbres sacrales.

### A.3 G-ratio vs densité axonale

Nous observons une corrélation entre le g-ratio et la densité axonale : le g-ratio diminue lorsque la densité axonale augmente.

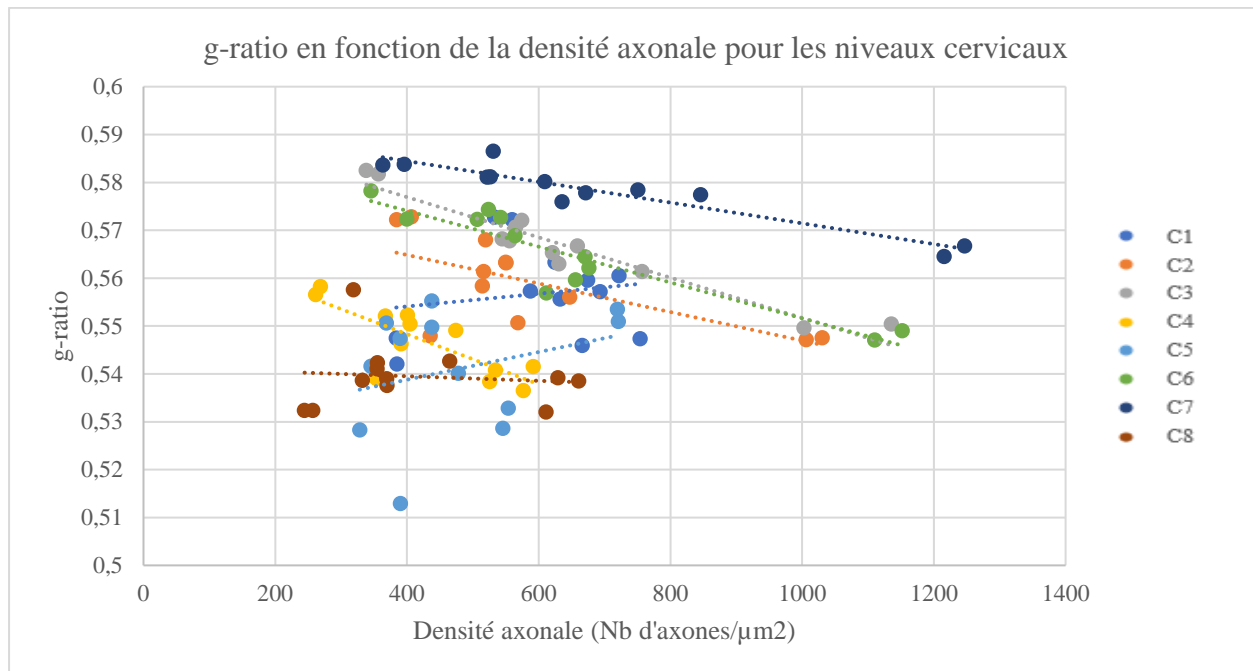


Figure A-9 : g-ratio vs densité axonale le long des vertèbres cervicales.

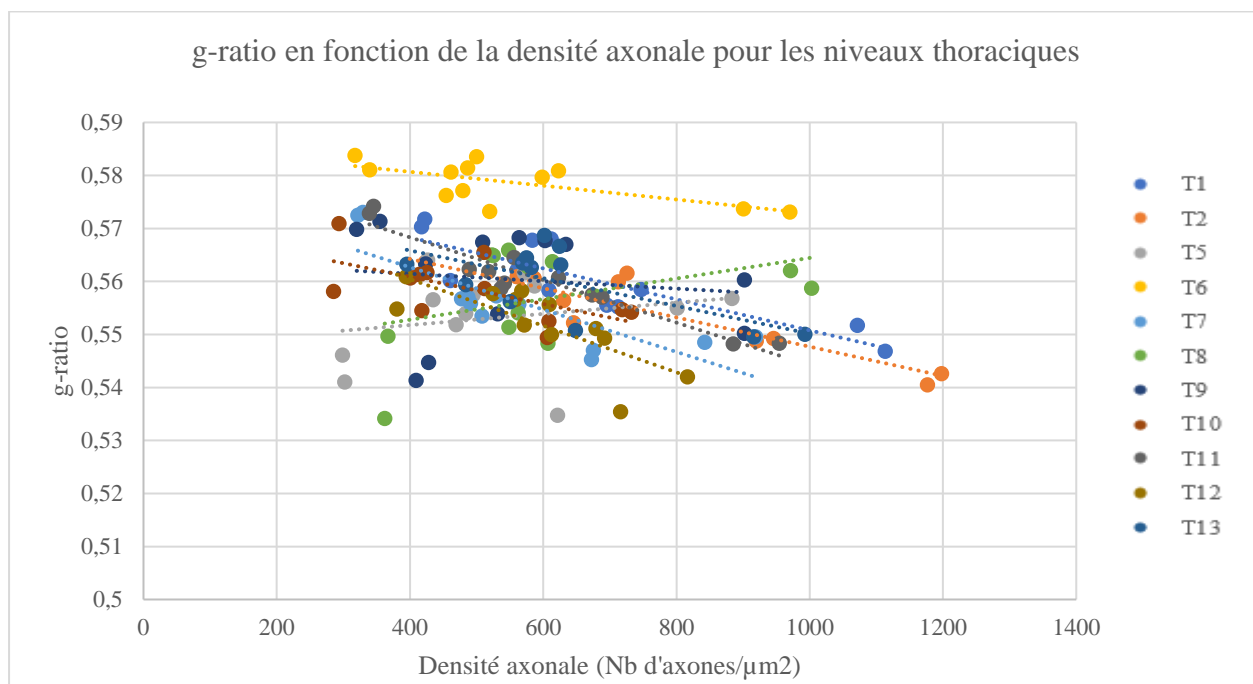


Figure A-10 : g-ratio vs densité axonale le long des vertèbres thoraciques.



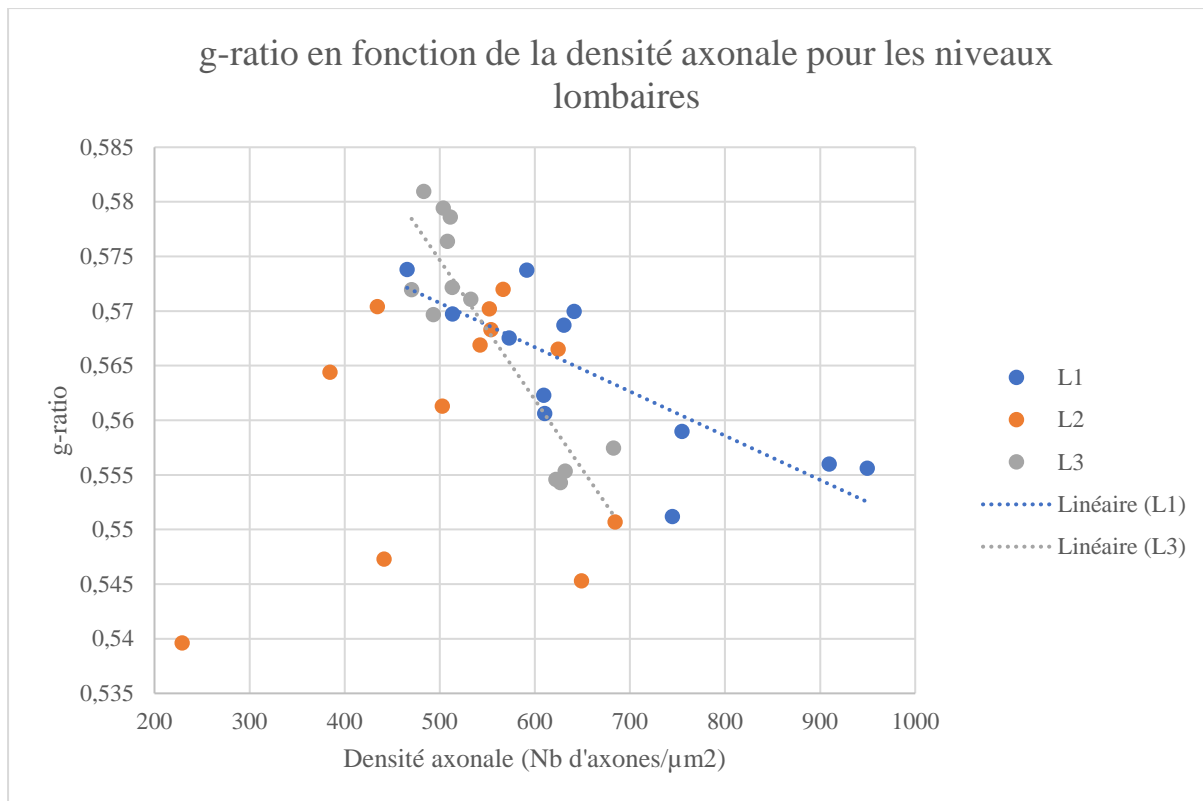


Figure A-11 : G-ratio vs densité axonale le long des vertèbres lombaires.

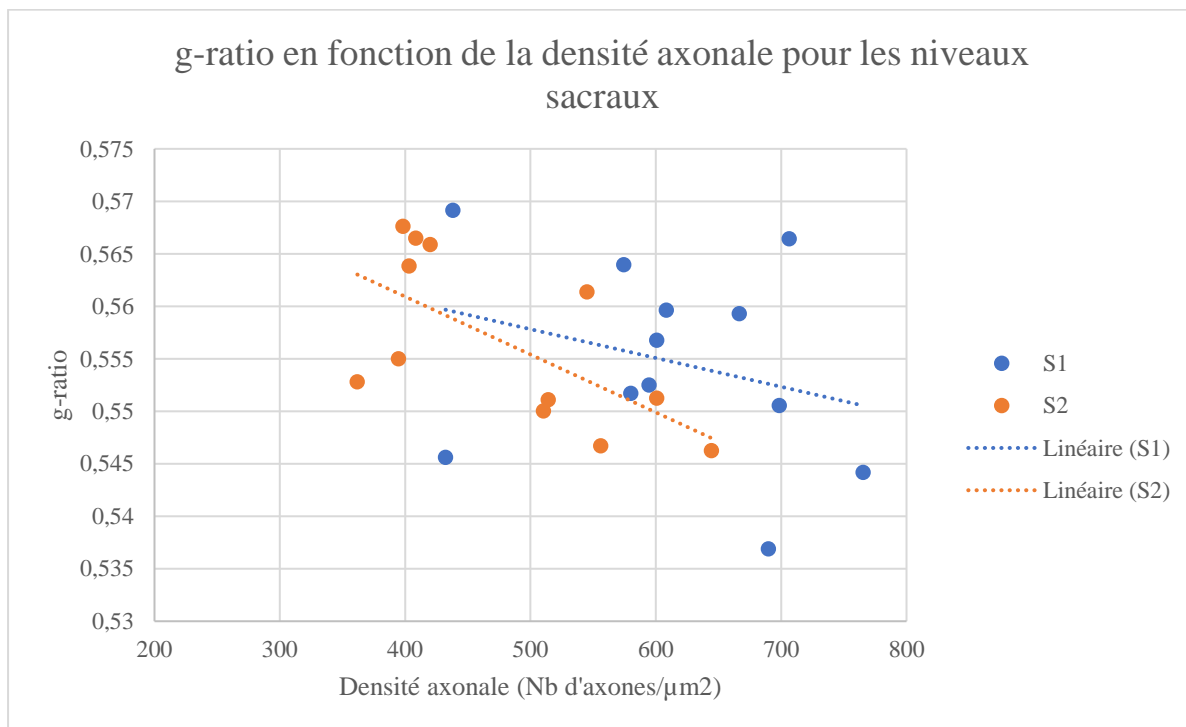


Figure A-12 : G-ratio vs densité axonale le long des vertèbres sacrales.

#### A.4 Diamètre axonal vs densité axonale

Nous observons une corrélation entre le diamètre axonal et la densité axonale le long des niveaux vertébraux : la densité axonale augmente lorsque le diamètre axonal diminue.

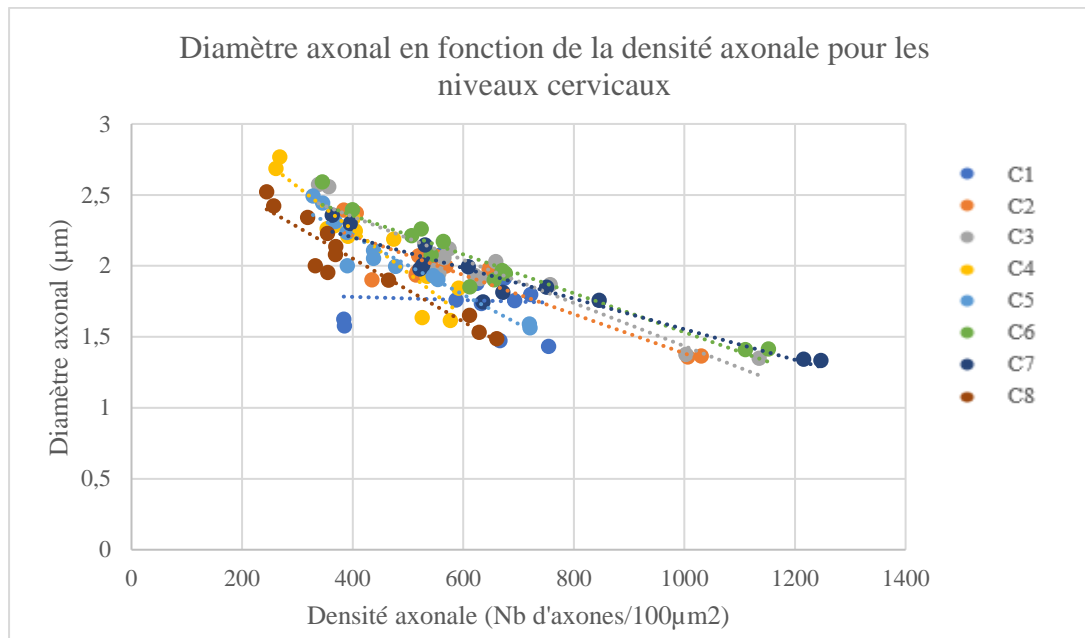


Figure A-13 : Diamètre axonal vs densité axonale le long des vertèbres cervicales.

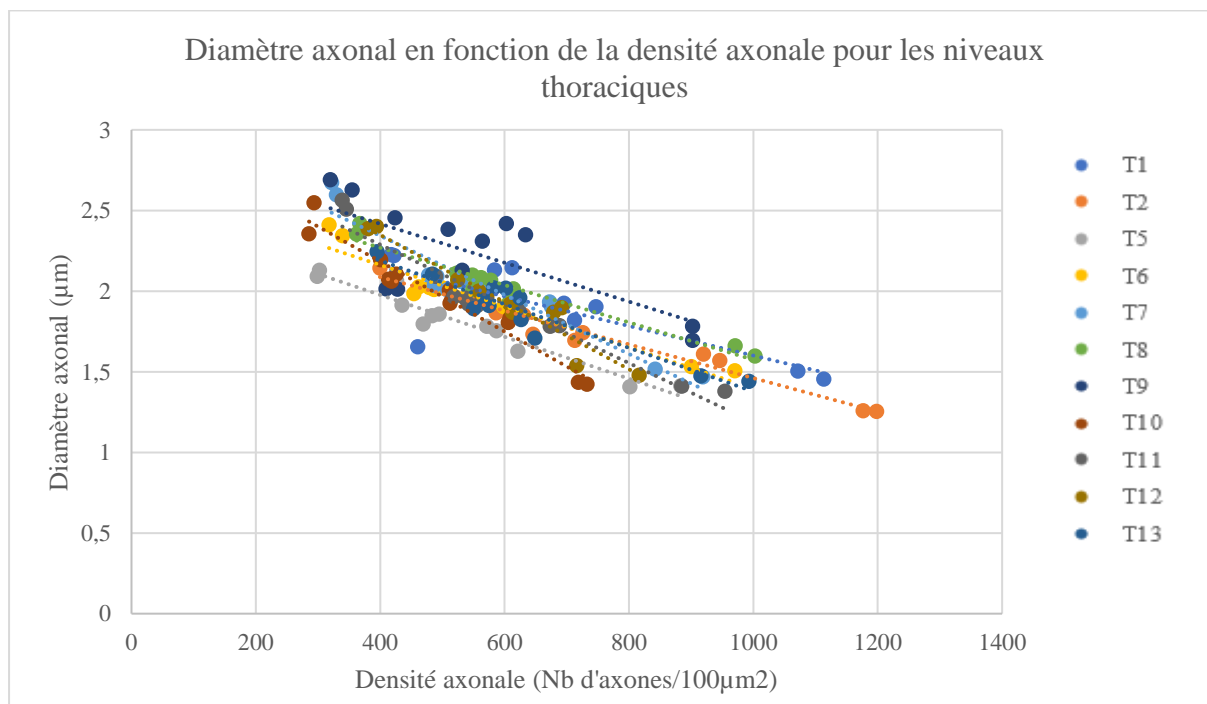


Figure A-14 : Diamètre axonal vs densité axonale le long des vertèbres thoraciques.

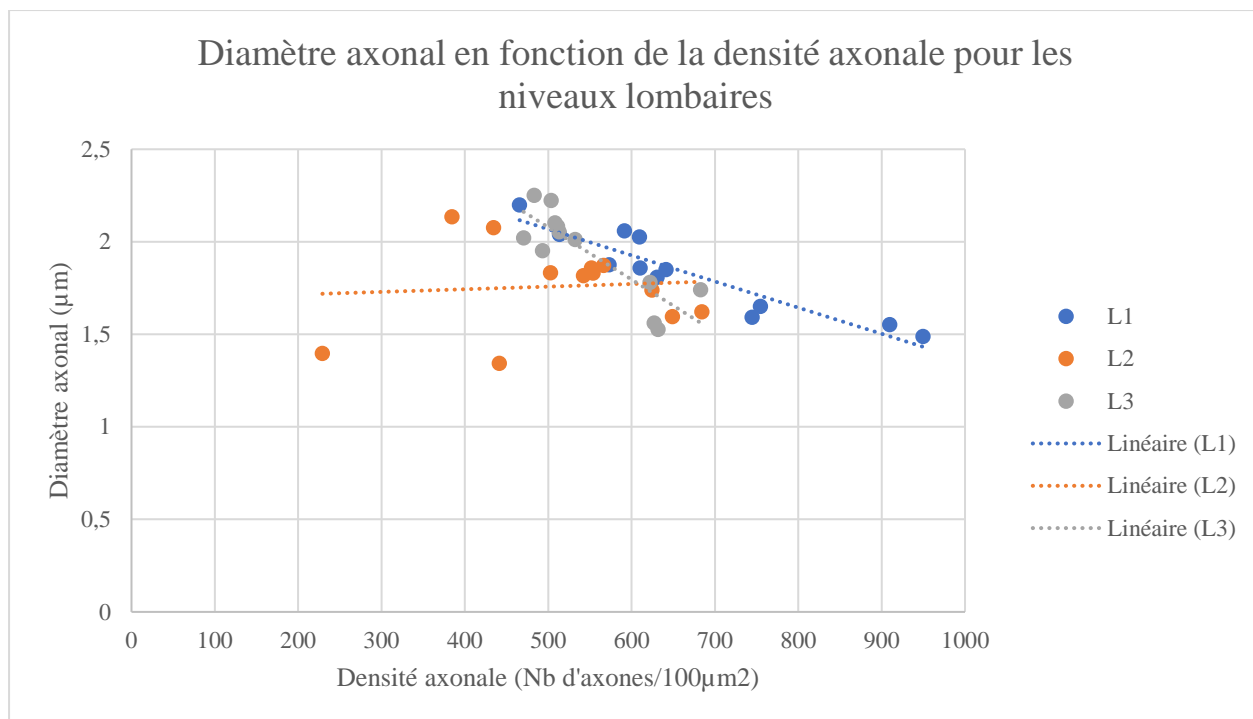


Figure A-15 : Diamètre axonal vs densité axonale le long des vertèbres lombaires.

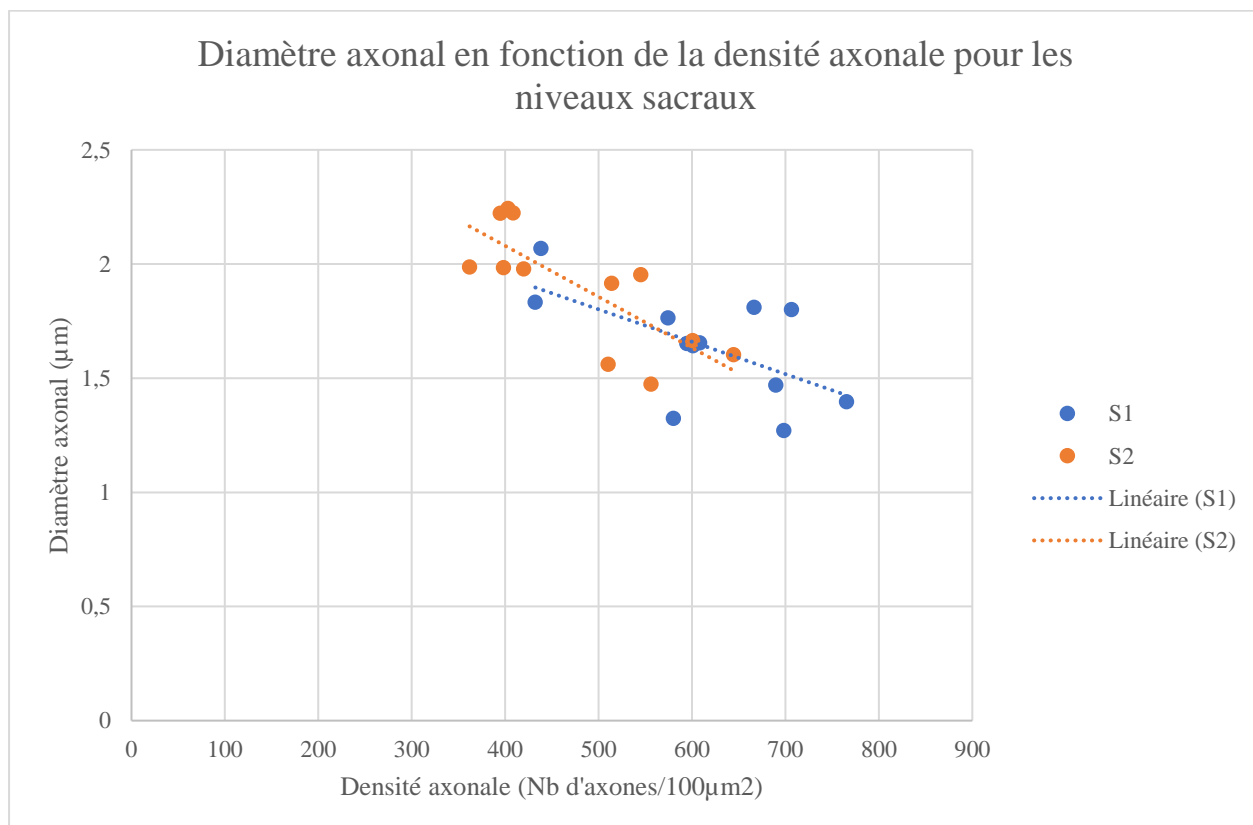


Figure A-16 : Diamètre axonal vs densité axonale le long des vertèbres sacrales.

## ANNEXE B – PHANTOMS DE MYÉLINE PAR CO-ELECTROSPINNING

### B.1 Introduction

#### B.1.1 Description

Selon l'enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes (ESCC), environ 93 500 canadiens sont touchés par la sclérose en plaques. Le taux de prévalence de la sclérose en plaques au Canada serait l'un des plus élevés au monde. La sclérose en plaques est une maladie complexe touchant le système nerveux central, qui comprend le cerveau, la moelle épinière et les nerfs optiques. Pour des raisons encore inconnues, les cellules immunitaires attaquent et détruisent la couche protectrice (myéline) qui entoure les neurones (axones), qui permettent aux signaux électriques de passer du cerveau au reste du corps. Dans un rapport publié en 2007, *le fardeau des maladies, troubles et traumatismes neurologiques au Canada*, l'Institut canadien d'information sur la santé (ICIS) a conclu que la sclérose en plaques a engendré des coûts directs de 139,2 millions de dollars et des coûts indirects de 811,3 millions de dollars au Canada en 2000-2001.

Les technologies IRM sont à ce jour les seules techniques permettant de caractériser de façon non-invasive et in vivo les anomalies du cerveau et de la moelle épinière (se caractérisant par la perte de la myéline sur les axones). Cependant, l'évaluation des techniques IRM in vivo est difficile car nous n'avons pas de données témoins : les détails des connections varient d'un individu à l'autre et la connectivité des fibres nerveuses humaines est encore mal connue. Des études sur l'injection de traceurs ne peuvent pas être réalisées sur les humains. C'est pourquoi les phantoms (répliques synthétiques mimant la structure étudiée) sont très utiles pour tester l'acquisition de l'IRM de diffusion et la tractographie. Les expériences qui seront réalisées dans le cadre de cette maîtrise s'intéresseront plus particulièrement aux axones de la matière blanche (i.e. aux prolongements des neurones qui permettent la communication neuronale).

#### B.1.2 Revue de littérature

La revue de littérature est une étape clé, demandant du temps, dans la réalisation du projet. Elle permettra de déterminer les avancées des autres équipes dans le domaine d'étude et constituera un point de départ pour la réalisation du projet.

Plusieurs auteurs ont travaillé sur la synthèse de phantoms de myéline dans le but de valider des résultats d'IRM. L'approche principale est l'utilisation de la technique de co-electrospinning. La recherche consistera à reproduire les résultats publiés dans ces articles et à les améliorer.

### **B.1.3 Problématique**

Le problème qui se pose dans le diagnostic des maladies neurodégénératives est le suivant : les images IRM ne sont pas assez précises pour détecter d'éventuelles lésions ou anomalies. Une des stratégies consiste donc à fabriquer des fibres qui miment les axones pour permettre de valider les images obtenues en IRM, i.e. optimiser la séquence de mesure lors d'un scan IRM pour ainsi avoir une image plus détaillée des structures à l'IRM. Cette stratégie est abordée dans la littérature et fait l'objet de ce projet de recherche.

### **B.1.4 Objectif général**

Le but du projet est de valider les résultats IRM sur la quantification de la myéline dans la moelle épinière chez l'homme.

### **B.1.5 Questions de recherche, hypothèses scientifiques, objectifs spécifiques**

#### **B.1.5.1 Questions de recherche (QR)**

Comment synthétiser des fibres mimant la structure de la myéline qui entoure l'axone ?

Comment réaliser des mesures IRM de ces fibres ?

#### **B.1.5.2 Objectifs spécifiques (OS)**

Afin de parvenir à atteindre cet objectif général, 3 objectifs spécifiques ont dû être déterminés et formulés :

- Trouver les matériaux (polymères) mimant au mieux le comportement de la myéline.
- Réaliser des fibres synthétiques creuses à partir de deux polymères (l'un formant la coquille et l'autre le cœur qui sera retiré pour rendre la fibre creuse) mimant la structure de la myéline de quelques micromètres de diamètre interne et dont l'épaisseur serait également de quelques micromètres (voire centaine de nanomètre).

- Faire varier l'épaisseur de la coquille et le diamètre du cœur pour obtenir des fibres de différentes tailles.
- Caractériser ces fibres par microscopie électronique (MEB et MET).
- Réaliser des tests mécaniques sur ses fibres : essais de traction et de fatigue.
- Réaliser un empilement de plusieurs milliers de fibres pour imager le profil IRM de ces fibres.
- Mesurer la diffusivité à travers la membrane des fibres et la comparer à celles des tissus biologiques in vivo.

### **B.1.5.3 Hypothèses scientifiques (HS)**

**Hypothèse #1** : La synthèse de phantoms mimant la structure de la myéline autour de l'axone permet de valider les résultats d'imagerie de résonance magnétique par diffusion.

**Hypothèse #2** : La technique de co-electrospinning permet d'obtenir des fibres du même ordre de grandeur que l'axone, i.e. de l'ordre du nanomètre et du micromètre.

**Hypothèse #3** : Le choix de matériaux à base de polymères tels que le PEO (Polyéthylène oxyde) et le PCL (Polycaprolactone) approximent la structure de la myéline (structure tubulaire, perméabilité membranaire ...).

### **B.1.6 Originalité et réfutabilité des QR, HS ou OS**

**Hypothèse #1** : Les phantoms de myéline sont un outil de calibration pour l'IRM de diffusion.

**Hypothèse #2** : La technique co-electrospinning (ou electrofilage) offre la possibilité de fabriquer des fibres de diamètre à l'échelle nanométrique permettant de construire des supports, « échafaudages » ou « scaffolds » de topographie micro ou nanométrique et de porosité comparable aux dimensions de la matrice extra-cellulaire et des axones. On peut électrofiler une large variété de polymères biodégradables, biostables, naturels ou artificiels pour obtenir des structures textiles d'architectures contrôlées servant de supports pour l'ingénierie tissulaire, applicables en médecine régénératrice.

**Hypothèse #3** : Les polymères utilisés dans ce rapport possèdent, comme la gaine de myéline, un caractère hydrophobe et poreux. Ces polymères ont l'avantage de très bien s'électrofiler.

**Réfutabilité** : Les hypothèses seront réfutées si les fibres synthétisées, par la technique choisie, ne permettent pas de valider les images IRM ; i.e si le biomimétisme de la myéline n'est pas optimal pour la validation des images IRM.

## **B.2 Activités et méthodologie**

**Phase #1** : Collecte d'informations

- Revue de la littérature sur la synthèse de phantoms de myéline
- Déterminer la technique la plus efficace pour synthétiser des fibres de l'ordre du nanomètre ou micromètre
- Choix des matériaux
- Formulation de la problématique

**Phase #2** : Élaboration d'un protocole de synthèse

- Optimisation des paramètres de synthèse de la technique electrospinning (dite mono axiale) pour chaque polymère (cœur et coquille) : distance entre l'aiguille de la seringue contenant le polymère et le support, vitesse d'infusion, voltage et concentration du polymère.
- Une fois que les paramètres du polymère constituant le cœur et du polymère constituant la coquille sont optimisés, il s'agit dès lors d'optimiser les paramètres de synthèse pour la technique co-electrospinning (dite coaxiale), i.e la technique permettant l'infusion des deux polymères en même temps sur le collecteur (support en papier d'aluminium).

**Phase #3** : Caractérisation des fibres synthétisées

- Caractérisation en microscopie électronique (MEB et MET) pour vérifier si les fibres sont bien creuses.
- Caractérisation mécanique : essai de fatigue; test permettant de mesurer le module d'élasticité des fibres.

**Phase #4** : Scans des fibres synthétisées

- Réalisation d'images d'IRM de diffusion de ces fibres.
- Mesure du coefficient de diffusion de ces fibres.

**Phase #5** : Feedbacks sur les scanners obtenus

- Il s'agit d'une phase potentielle.
- En fonction des résultats obtenus sur les scans : modification du protocole de synthèse.

**Phase #6** : Réflexion de l'évolution du projet vers un sujet de doctorat

- Recherche sur la chimie de surface, pour modifier la surface des fibres de polymères et générer une structure multicouche caractéristique de la myéline.

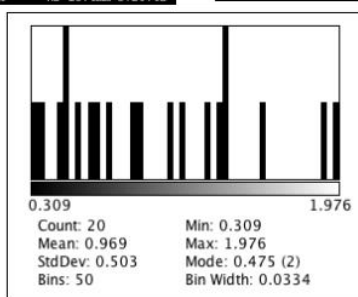
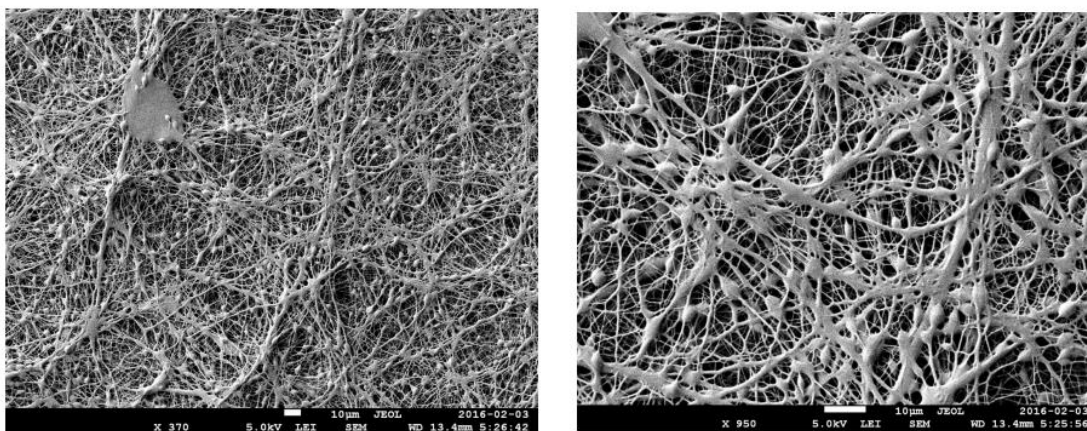
**Phase #7** : Rédactions

- Rédaction d'un article
- Rédaction du mémoire de maîtrise

Il est à noter que ce projet n'est effectué qu'en laboratoire.

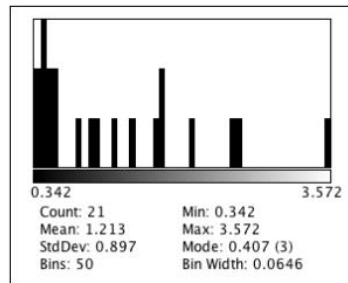
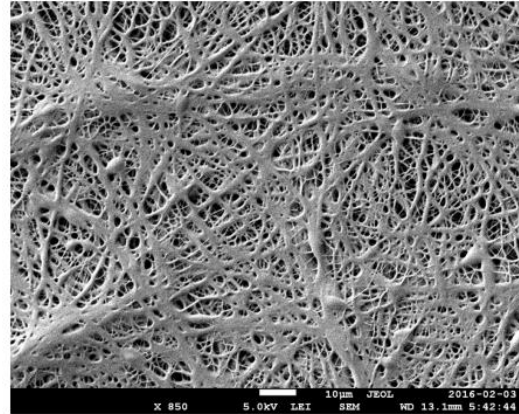
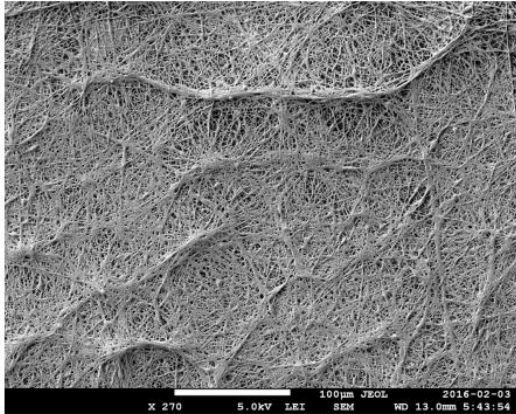
**B.3 Résultats préliminaires**

- Fibres de PCL 10%

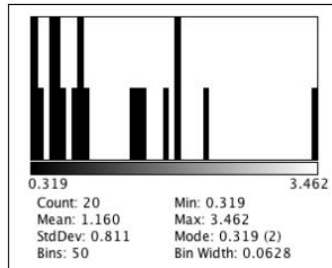
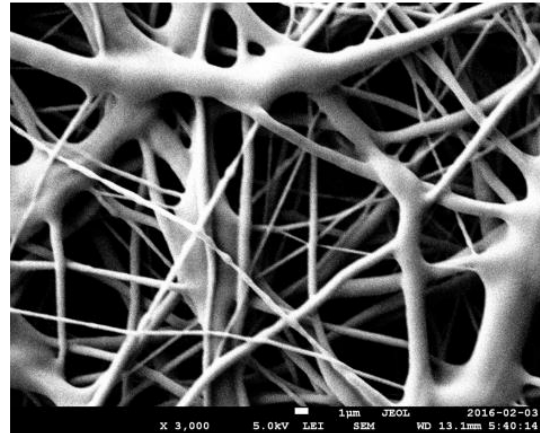
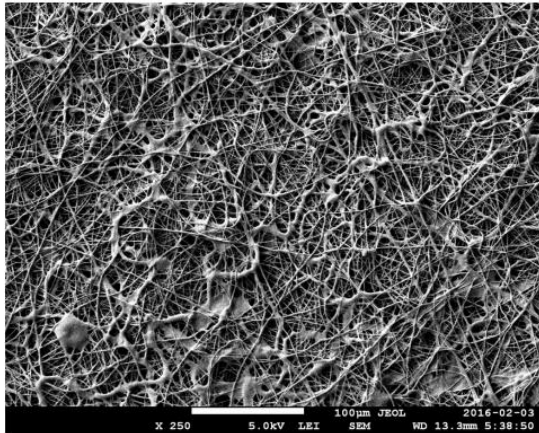




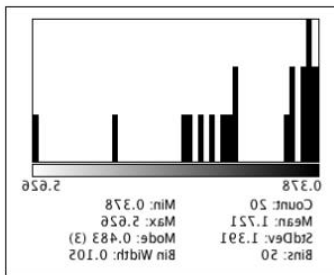
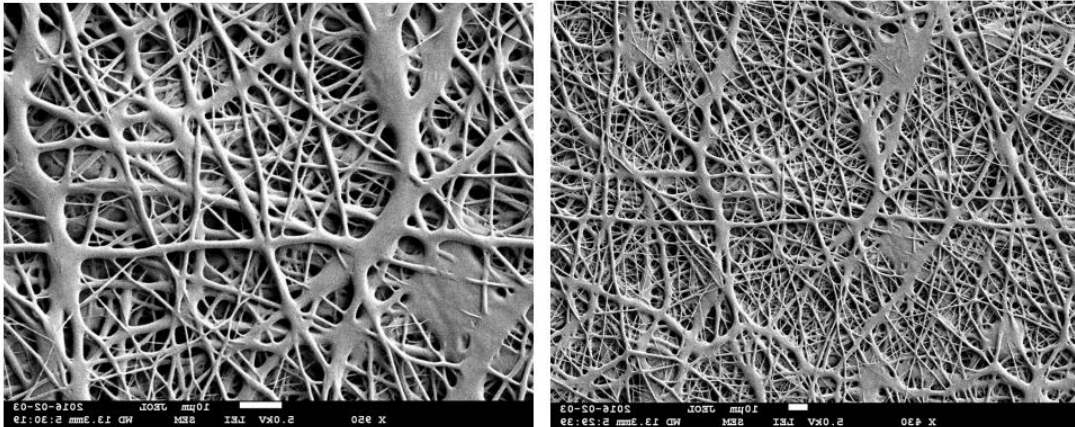
- Fibres de PCL 11%



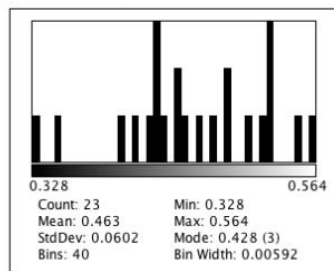
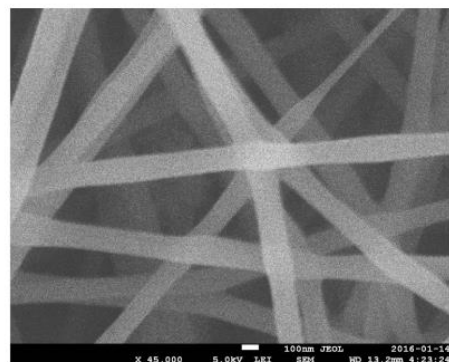
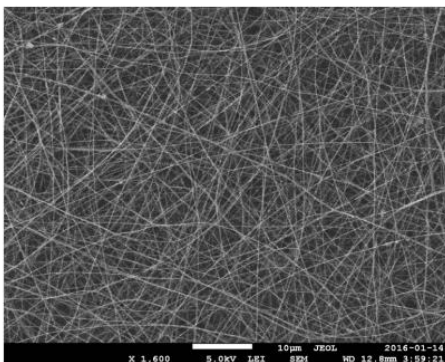
- Fibres PCL 12%



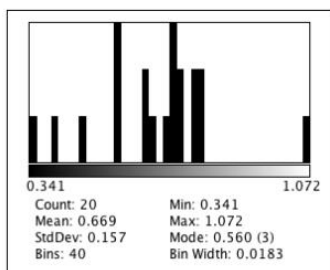
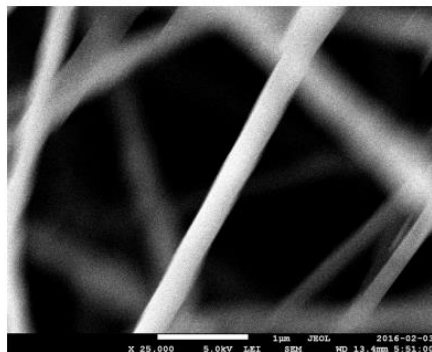
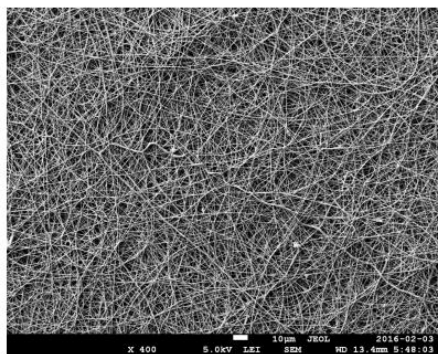
- Fibres de PCL 13%



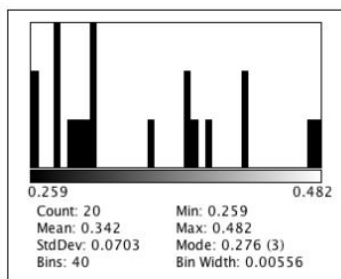
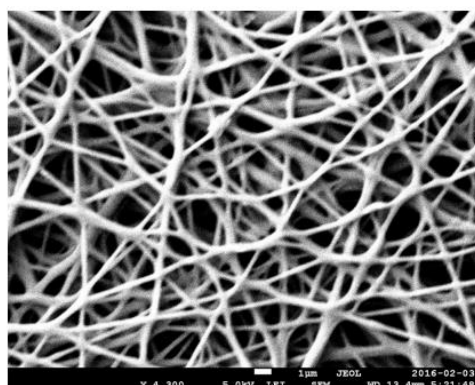
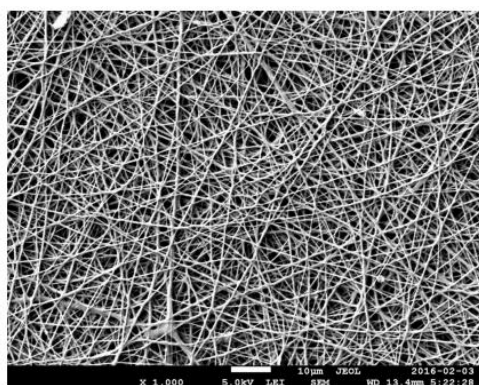
- Fibres de PEO 3%



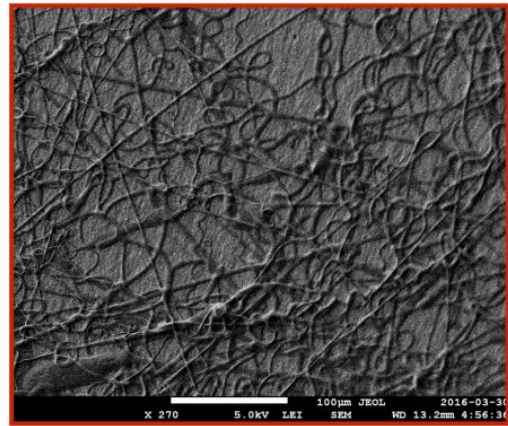
- Fibres PEO 4%



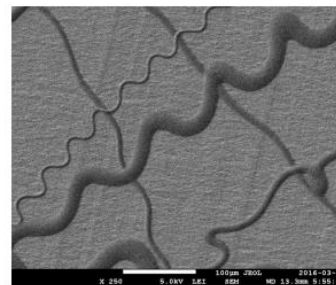
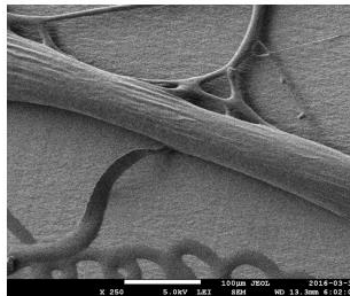
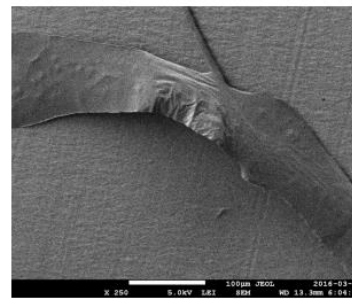
- Fibres PEO 5%



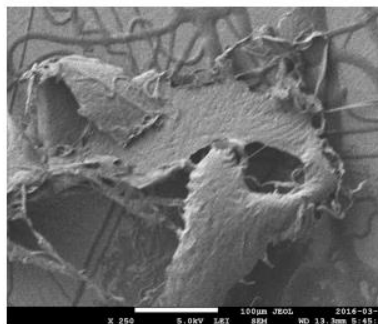
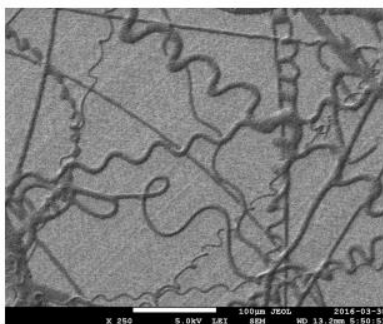
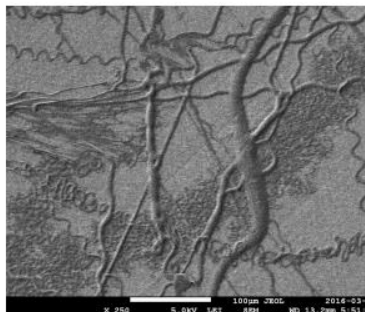
- Co-electrofilage : 15 kV, distance(aiguille-collecteur) =8.5cm



- Co-electrofilage : 12 kV, distance(aiguille-collecteur) =20cm



- Co-electrofilage : 20 kV, distance(aiguille-collecteur) =20cm



- Co-electrofilage PEO 1% et PCL 4% : 20 kV, distance(aiguille-collecteur) =10cm

